



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO
POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD IRAPUATO

**Filogenómica como un enfoque para comprender el carácter
anfibiote de *Clavibacter michiganensis***

Tesis que presenta

Alan Guillermo Yañez Olvera

Para Obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

En la Especialidad de

Biotecnología de Plantas

Director de la Tesis: Dr. Francisco Barona Gómez

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento durante el tiempo que duró mi maestría (número de registro becario 614044 / número de beca 456308), nada de esto habría sido posible sin su apoyo.

A mis sinodales, el Dr. John Paul Délano Frier y el Dr. Rafael Montiel Duarte, por su valiosa ayuda.

A mi asesor el Dr. Francisco Barona Gómez por toda su guía, apoyo y aliento para la finalización de este trabajo (¡Muchas gracias Paco!).

A todo los miembros del laboratorio 14, también a aquellos que nos visitaron brevemente.

A mis amigos, desde el más viejo hasta el más nuevo, gracias por las risas :). Gracias Emi.

Especialmente a mi familia, que nunca deja de apoyarme. Los amo.

Y a usted que se está tomando el tiempo de leer esto.

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 La adaptabilidad de las bacterias	9
1.1.1 La filogenómica y la genómica comparativa	9
1.2 Interacciones planta-microorganismo	10
1.3 Anfibionte	11
1.3.1 Lecciones del anfibionte más famoso.	11
1.4 Taxonomía de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	12
1.5 <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (<i>Cmm</i>) y el cancro bacteriano	13
1.5.1 Infección por <i>Cmm</i> y síntomas del cancro bacteriano	13
1.6 Elementos funcionales asociados al desarrollo del cancro bacteriano	14
1.6.1 Proteasas	15
1.6.2 CAZymes	15
1.6.2.1 PCWDE	15
1.6.2.2 Otras CAZymes	16
1.6.3 Otros elementos asociados al desarrollo del cancro bacteriano	16
2. ANTECEDENTES	17
2.1 Análisis genómicos de <i>Clavibacter</i> spp.	17
2.2 Diversidad genética en <i>Cmm</i>	17
2.3 Variación en la capacidad de patogenicidad y virulencia	17
2.4 Observaciones de campo	18
5. HIPÓTESIS	19
6. OBJETIVO PRINCIPAL	19
6.1 Objetivos específicos	19
7. METODOLOGÍA	20
7.1 Aislamiento de cepas bacterianas	20
7.2 Identificación de cepas bacterianas	20
7.3 Secuenciación	21
7.4 Construcción de la base de datos genómica	21
7.5 Reconstrucciones filogenómicas	21
7.6 Análisis filogenómico con énfasis funcional	21
7.6.1 Búsqueda de CAZymes y proteasas	21

7.6.2 Clasificación y anotación funcional de enzimas	22
8. RESULTADOS	23
8.1 Incremento de la base de datos genómica	23
8.1.1 Colecta de plantas silvestres en la búsqueda de cepas de <i>Clavibacter</i>	23
8.1.2 Identificación de las cepas aisladas y aislamiento de RA1B, una cepa de <i>Clavibacter</i> obtenida de una planta silvestre	24
8.1.3 Ensamble final de la base de datos genómica	25
8.2 Análisis filogenómicos	26
8.2.1 Reconstrucción filogenómica de <i>Clavibacter</i> : ¿Cómo se relacionan las cepas de <i>Clavibacter</i> ?	26
8.2.2 Influencias del tiempo y el hospedero en <i>Cmm</i> : relaciones entre las características poblacionales de los hospederos de <i>Cmm</i> y la reconstrucción filogenómica	30
8.3 Genómica comparativa	32
8.3.1 Diferencias de abundancia de proteasas y PCWDE en el género <i>Clavibacter</i>	32
8.3.2 Exploración de familias de proteasas y PCWDE: variación en los perfiles de presencia y ausencia en el género <i>Clavibacter</i>	34
8.3.3 Secretoma variable: diferencias en el secretoma de las cepas de <i>Cmm</i> con respecto a la cepa de referencia NCPPB 382	37
9. DISCUSIÓN	41
9.1 ¿No hay especies del género <i>Clavibacter</i> en hospederos silvestres?	41
9.2 Inferencias desde la filogenia	41
9.3 El papel de la abundancia de proteasas y PCWDE	43
9.4 Perfiles distintivos de proteasas y PCWDE: ¿se relacionan con los hospederos?	43
9.5 Secretomas distintos: más allá de la presencia o ausencia de genes	44
9.6 Consideraciones finales sobre la naturaleza anfibionte de <i>Clavibacter</i>	45
10. CONCLUSIONES	47
11. PERSPECTIVAS	48
12. DATOS SUPLEMENTARIOS	50
13. BIBLIOGRAFÍA	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Modelo de predicción de coevolución de interacciones mutualistas y parasítico-patógenicas respecto a la calidad y la complejidad biótica de un ambiente.	10
Figura 2 Esquema de la isla de patogenicidad (PAI) encontrada en NCPPB 382.	13
Figura 3 Ciclo y vías de infección por <i>Cmm</i> en <i>S. lycopersicum</i> .	14
Figura 4 Localización de los sitios de muestreo de plantas para la obtención de aislados de <i>Clavibacter</i> .	24
Figura 5 Aislados bacterianos identificados mediante el análisis de la subunidad 16S del gen rRNA	25
Figura 6 Árbol filogenético del género <i>Clavibacter</i> .	26
Figura 7 Árbol filogenético de cepas de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> .	29
Figura 8 Asociación del árbol filogenético de <i>Cmm</i> con los datos de las características poblacionales de los hospederos	31
Figura 9 Abundancia relativa de PCWDE y proteasas en los genomas analizados del género <i>Clavibacter</i> .	33
Figura 10 <i>Heatmap</i> de familias de genes de proteasas presentes en el género <i>Clavibacter</i> y organismos cercanos	35
Figura 11 <i>Heatmap</i> de familias de genes de PCWDE presentes en el género <i>Clavibacter</i> y organismos cercanos	36
Figura 12 <i>Heatmap</i> de familias de genes de proteasas presentes en el género <i>Clavibacter</i> y algunos géneros cercanos en las que se detectaron péptidos señal	38
Figura 13 <i>Heatmap</i> de familias de genes de PCWDE presentes en el género <i>Clavibacter</i> y algunos géneros cercanos en las que se detectaron péptidos señal	39
Figura suplementaria 1 Abundancia relativa de PCWDE y proteasas en los genomas analizados del género <i>Clavibacter</i> y géneros cercanos	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características generales del genoma de RA1B	27
Tabla 2 Función predicha de familias de proteasas con péptido señal	40
Tabla 3 Función predicha de familias de PCWDE con péptido señal	40
Tabla suplementaria 1 Lista de las muestras de plantas colectadas en estado silvestre	50
Tabla suplementaria 2 Lista de cepas bacterianas aisladas a partir de las muestras de plantas en estado silvestre.	51
Tabla suplementaria 3 Cepas dentro de la base de datos genómica.	61

RESUMEN

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) es una bacteria Gram-positiva, responsable de la enfermedad conocida como cancro o chancro bacteriano en tomate (*Solanum lycopersicum*), la cual causa pérdidas económicas sustanciales alrededor del mundo. Reportes previos apuntan a la existencia de elementos ligados a la patogenicidad codificados en plásmidos y en una isla de patogenicidad en el cromosoma. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que muchos de estos elementos podrían no ser ubicuos entre todas las cepas de *Cmm*. Además, algunos de éstos podrían no ser esenciales para el desarrollo de la enfermedad, aunque podrían tener influencia en la virulencia.

A través de los años, datos recolectados por el Laboratorio de Evolución de la Diversidad Metabólica han apuntado a la existencia de un vínculo entre el ambiente, donde habitan las plantas hospederas de *Cmm*, y el desarrollo de la enfermedad. El conocimiento de las interacciones de bacterias fitopatógenas proviene principalmente de organismos Gram-negativos, como las proteobacterias, por lo que se conoce mucho menos de las interacciones entre las plantas y las bacterias Gram-positivas. Con el surgimiento y el desarrollo de tecnologías de secuenciación de nueva generación, la posibilidad de conocer y estudiar genomas procariontes se ha incrementado en gran medida. Los datos genómicos nos permiten obtener una imagen del repertorio de genes de un organismo, lo que a su vez nos provee de pistas e ideas de los mecanismos con los que interactúa con otros seres vivos. Aún más, la comparación de estos elementos genómicos con organismos cercanamente relacionados puede develar aspectos importantes sobre la evolución de rasgos de patogenicidad.

Para este proyecto, se trabajó en la expansión de la base de datos genómica disponible, tanto de *Cmm* como de otros organismos cercanamente emparentados, mediante el aislamiento de cepas provenientes de plantas silvestres. El fin era obtener más genomas para poder establecer una clasificación *ad hoc* a la naturaleza del cancro bacteriano de las cepas mediante el uso de genómica comparativa. Dicha clasificación se basó en rasgos funcionales en conjunto con criterios taxonómicos, evolutivos y ecológicos. Se propone que la clasificación sirva como base para la caracterización de los grupos más contrastantes, para diseñar experimentos que contribuyan a comprender cómo y porqué se desarrolla el cancro bacteriano, para eventualmente diseñar estrategias de diagnóstico para su control en tomate.

ABSTRACT

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) is a Gram-positive bacteria, responsible for bacterial wilt and canker in tomato (*Solanum lycopersicum*), a disease that results in huge economical losses worldwide. Previous reports showed the existence, in *Cmm*, of pathogenicity determinants coded in plasmids and a pathogenicity island in the chromosome. However, recent studies have shown that these elements might not be ubiquitous among all *Cmm* strains. Moreover, some of them might not be essential for disease development but could influence virulence. Over the years, data collected by the Evolution of Metabolic Diversity Laboratory have pointed to the existence of a link between the *Cmm*-host plants' environment and disease development. Knowledge of plant-pathogenic bacteria interactions comes mostly from Gram-negative bacteria, but much less is known about the mechanisms employed by Gram-positive pathogenic bacteria to interact with plants. With the emergence of next generation sequencing technologies, the number of entire genomes, mainly from prokaryote organisms, has increased greatly. Whole genome sequence data allowed us to have a clearer picture of the gene repertoire of an organism, which in turn provided us with clues and insights of its mechanisms of interaction with other organisms. Furthermore, genome comparison with closely related organisms shed some light on the evolution of pathogenic traits.

In the present work, *Cmm* and closely related bacterial strains were isolated from wild plants, to expand the available genome database. The goal was to acquire more genomes to establish a bacterial canker nature-*ad hoc* classification of the strains using comparative genomics. This classification was based on functional traits along with taxonomic, evolutionary and ecological criteria. The classification might be used as a foundation for the characterization of the most contrasting groups to design experiments that contribute to the understanding about how and why the bacterial canker is able to develop.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La adaptabilidad de las bacterias

Las bacterias son, y serán, una de las formas de vida más exitosas de la Tierra. Prueba de ello es que, aunque se encuentran detrás de las plantas en términos de la biomasa total del planeta (Bar-On et al., 2018), hasta ahora la mayor parte de la diversidad de especies que se ha encontrado en el planeta se ha derivado especialmente de bacterias. Más aún, la distribución de estos organismos en el planeta es virtualmente tan variada como la diversidad de ambientes existentes: si un rincón puede ser habitado por formas de vida, casi seguramente éstas serán microorganismos. Estos seres vivos son capaces de llevar a cabo semejante proeza, ya que poseen una gran combinación de mecanismos de respuesta a factores ambientales, lo que les da la habilidad de adaptarse a un sinnúmero de condiciones (Bleuven & Landry, 2016; Dutta & Paul, 2012).

La pérdida, ganancia y la modificación de genes, donde se codifican los mecanismos para hacerle frente a los cambios ambientales, moldean la arquitectura del genoma de estos microorganismos. Dicha dinámica les da acceso a un amplio repertorio genético (Bobay & Ochman, 2017; Pallen & Wren, 2007), algo que constituye otro de los pilares de su capacidad de respuesta. Esta flexibilidad genómica no sólo les permite responder rápidamente a su entorno; también tiene una enorme influencia en las interacciones que establecen con otros organismos. Tanto la dinámica genómica, como los procesos biológicos que subyacen bajo las interacciones entre las bacterias y sus hospederos, son un objeto creciente de estudio, mediante enfoques como la filogenómica y la genómica comparativa (Gutiérrez-García et al., 2018; Simon et al., 2017; Wattam et al., 2014).

1.1.1 La filogenómica y la genómica comparativa

La secuenciación del primer genoma completo marcó el inicio del campo de la genómica y la llegada de las tecnologías de secuenciación de nueva generación ayudó a su florecimiento. Hubo un dramático incremento en la obtención de información genómica de muchos organismos, principalmente aquellos de genomas pequeños como las bacterias (Land et al., 2015). La disponibilidad de genomas enteros no solamente ha dado cuenta de la variabilidad de los genomas bacterianos, también ha cambiado la visión de cómo éstos evolucionan. Los microorganismos cuentan con mecanismos que les permiten incrementar, disminuir o reacomodar grandes porciones de sus genomas rápidamente, lo que les permite responder con igual velocidad a cambios ambientales y adaptarse a nuevos nichos (Weissenbach, 2016).

Entender cómo se desarrolla este proceso adaptativo es especialmente importante cuando se estudia un organismo capaz de causar una enfermedad. La observación de las diferencias y similitudes de ciertos rasgos funcionales entre cepas de una especie no solamente ayuda a comprender la historia epidemiológica de ésta, también proveen información del conjunto de genes determinantes para la patogenicidad. Así mismo, la comparación con otras especies relacionadas permite comprender cómo evolucionan estos rasgos (Klemm & Dougan, 2016; Bentley & Parkhill, 2015). Este enfoque, útil para el estudio de un organismo desde las perspectivas evolutiva y genómicas, se le llama filogenómica. En este trabajo se propone el análisis de los rasgos de *Cmm* bajo la lupa de la filogenómica para determinar la

relación entre su comportamiento con la variación genómica durante el desarrollo del cancro bacteriano, complementando los análisis de genómica comparativa publicados durante el desarrollo de esta tesis (Tambong, 2017; Thapa et al., 2017).

1.2 Interacciones planta-microorganismo

Dentro de las interacciones entre planta y microorganismos existen distintas variables que las hacen diversas. Pueden establecerse entre tejidos específicos de la planta hospedera; pueden ocurrir dentro o fuera de la planta, en momentos específicos, o establecerse entre organismos específicos o comunidades enteras (Imam et al., 2016). Los resultados de esta interacción para la planta pueden variar desde ser benéficos hasta desfavorables, lo que puede tener un gran impacto en su desarrollo. Dado el resultado de esta relación, un microorganismo puede ser tradicionalmente clasificado dentro de un rango que va de mutualista a patógeno. La evolución de este tipo de relaciones está altamente influenciada por el contexto en el que el par microbiota-hospedero se desenvuelve. Existen modelos que predicen que la calidad ambiental (entendida como la abundancia de todos los recursos y factores que pueden impactar el crecimiento, reproducción y supervivencia de un organismo), así como la complejidad biótica de un ambiente (número potencial de especies o cepas con las que se podrían interactuar y tener conflictos ecológicos y evolutivos), pueden promover la inclinación a formar relaciones mutualistas o parasítico-patógenicas en un ecosistema (Thrall et al., 2007; Fig. 1). Sin embargo, un microorganismo usualmente no se ajusta exactamente a una categoría en particular (Newton et al., 2010). Algunos microorganismos pueden cambiar su relación con su hospedero debido a su ciclo natural (Koeck et al., 2011), mientras que, en otros, es parte de su respuesta al contexto en el que viven. A los organismos que entran dentro de esta segunda categoría se les denomina **anfibiotes**.

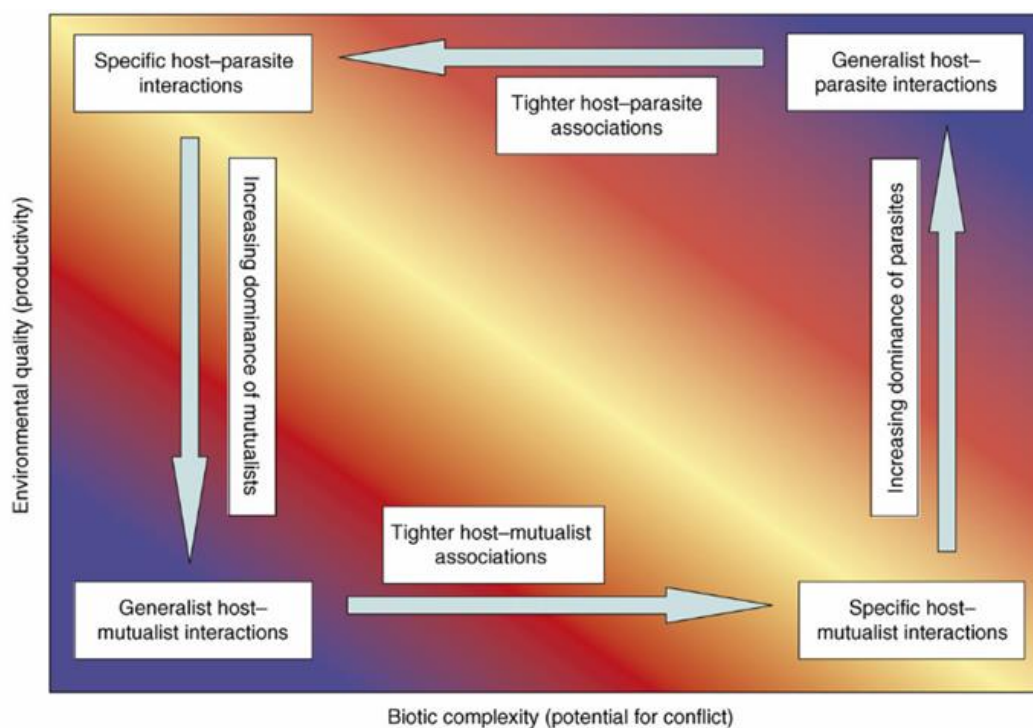


Figura 1. Modelo de predicción de coevolución de interacciones mutualistas y parasítico-patógenicas respecto a la calidad y la complejidad biótica de un ambiente (tomado de Thrall et al., 2007). Las cajas en las esquinas describen los estadios de coevolución de las interacciones de organismos en un ambiente como consecuencia del aumento o disminución de la calidad ambiental o la complejidad biótica. Las flechas describen los cambios que se dan entre estos estadios a medida que la calidad ambiental o la complejidad biótica varían.

1.3 Anfibionte

Usualmente, se define a un anfibionte como un organismo que, dependiendo del contexto, puede cambiar de una relación mutualista a una patógena y viceversa (Cho & Blaser, 2012). Si bien esta definición contiene la característica principal de un anfibionte, que es el cambio en la interacción dependiente del contexto, requiere del aporte de más detalles para comprender qué características están presentes en estos organismos y sus implicaciones.

Para Theodore Rosebury (1962), el término comensal acarrea cierta imprecisión al describir la relación que tenían ciertos microorganismos con sus hospederos. Rosebury pensaba que la palabra “comensal” implicaba una relación de naturaleza pasiva o mutuamente neutral entre hospederos y microbios, algo que consideró incorrecto dado que no se ajustaba con las observaciones de estos organismos actuando, en ocasiones, como patógenos. Por otra parte, se percató que en algunos microorganismos podían existir a la vez caracteres asociados con distintos tipos de interacciones como patogénicas o comensales. Para describir la naturaleza variable de estos organismos, Rosebury acuñó el término anfibionte como una posición espectral entre el mutualismo y la patogenicidad que también puede combinarse con estos estados.

Stanier y colaboradores (1986) retomaron la idea de una relación variable entre microbios y hospederos e incluso fueron más allá al sugerir que este cambio en la interacción está relacionado con las condiciones ambientales. Múltiples observaciones, más recientes, apoyan tanto la visión de Rosebury como la del grupo de Stanier: Muchos de los microorganismos que viven en asociación con un hospedero tienen estilos de vida que albergan la posibilidad de distintos tipos de interacciones con éste, lo cual está en función del contexto en los que se encuentren. ¿Pero, qué elementos forman parte del *contexto*?

1.3.1 Lecciones del anfibionte más famoso.

Helicobacter pylori es sin duda el ejemplo más conocido de un organismo anfibionte. Conocida como una bacteria relacionada con el desarrollo de enfermedades como úlcera gástrica, tejido linfoide asociado a mucosas, tumores y adenocarcinomas gástricos en humanos (Thaker 2016), *H. pylori* también ha sido asociada a la disminución del riesgo de desarrollar reflujo gastroesofágico y cáncer de esófago (Blaser, 2005). Debido a su gran notoriedad, se han llevado a cabo numerosos estudios sobre *H. pylori* los cuales aportan ejemplos sobre los elementos que conforman el *contexto* a los que responde un anfibionte.

El primero de estos elementos es el ambiente al que *H. pylori* como su hospedero están sujetos. En el caso de esta bacteria, la influencia del ambiente se traduce, por ejemplo, como factores asociados a la dieta de su hospedero, la cual puede estar influenciada por factores demográficos y del estilo de vida de éste (Akhter et al., 2007). El mismo hospedero es otro de los elementos dentro del contexto. El tracto intestinal de aproximadamente la mitad de la población mundial está colonizado por *H. pylori* (Hooi et al., 2017). Sin embargo, la infección con esta bacteria normalmente no presenta síntomas (Diaconu et al., 2017). Estudios apuntan a factores fisiológicos, como la edad, o factores genéticos que hacen a algunos individuos más propensos a desarrollar las enfermedades asociadas con la presencia de esta bacteria (Atherton & Blaser, 2009; Märginean et al., 2017). El último de los elementos que influyen sobre el comportamiento de *H. pylori* es la comunidad de microorganismos con la que

comparte su nicho. Dependiendo de su composición, ésta tiene un efecto promoviendo o atenuando su comportamiento patogénico (Martin & Solnick, 2014).

Cabe mencionar que hay otro elemento fuera del contexto que tiene un gran peso sobre el comportamiento anfibionte de *H. pylori* y este es su contenido genómico. La variación en la presencia o modificación de elementos genómicos clave en la interacción de *H. pylori* con su hospedero tiene como resultado que en cepas distintas se observen diferentes efectos sobre la interacción, por ejemplo: en la señalización celular bacteria-hospedero, lo que a su vez implica distintos riesgos de desarrollar enfermedades asociadas con la presencia de esta bacteria (Atherton & Blaser, 2009). Es decir, que el contenido genómico de una cepa de *H. pylori* puede favorecer que la respuesta de esta bacteria a su contexto se incline hacia un lado u otro del espectro mutualista-patógeno.

¿Qué otros ejemplos de anfibiontes existen? Como se desarrolla más adelante en esta tesis, la enfermedad en tomate (*Solanum lycopersicum*) conocida como cancro bacteriano causada por la actinobacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), es otro caso de un organismo anfibionte en el cual se han visto semejanzas en cuanto a la influencia del contexto (ambiente, hospedero, comunidad) y contenido genómico en el desarrollo de la enfermedad causada por esta bacteria.

1.4 Taxonomía de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Cmm pertenece al orden de las *Micrococcales*, que comprende a un grupo diverso dentro del filo Actinobacteria, las cuales son bacterias Gram-positivas con alto contenido de (G + C) y que ocupan una amplia variedad de nichos. Dentro de éstos se encuentran el suelo, tractos intestinales de animales, cuerpos de agua dulce y salada, plantas e insectos, entre otros (Behrendt, 2002; Bredon et al., 2018; Dhanjal et al., 2011; Han et al., 2003; Hird et al., 2015). Hay 15 familias reconocidas dentro de este orden: *Brevibacteriaceae*, *Cellulomonadaceae*, *Dermabacteraceae*, *Dermatophilaceae*, *Intrasporangiaceae*, *Jonesiaceae*, *Promicromonosporaceae*, *Bogoriellaceae*, *Dermacoccaceae*, *Rarobacteraceae*, *Sanguibacteraceae*, *Beutenbergiaceae*, *Ruaniaceae*, *Micrococcaceae* y *Microbacteriaceae* (Busse, 2015). Esta última familia es notable por tener cinco géneros distintos de bacterias con especies fitopatógenas conocidas: *Arthrobacter*, *Curtobacterium*, *Rathayibacter*, *Leifsonia* y *Clavibacter* (Eichenlaub & Gartemann, 2011).

Hasta hace poco se reconocía a *Clavibacter michiganensis* como una única especie, con 9 subespecies, 7 de las cuales estaban asociadas a hospederos específicos y 2 a semillas de pimiento y chile. Sin embargo, análisis genómicos recientes han resultado en la reclasificación de estas subespecies en distintas especies (Li X, et al., 2017; Starodumova et al., 2018). La mayor parte de las especies reconocidas de *Clavibacter* tienen la capacidad de infectar y causar enfermedad en los hospederos de donde fueron aisladas (Eichenlaub et al., 2006). Sin embargo, existen algunas excepciones a esto, tales como *C. chilensis* y *C. michiganensis* subsp. *californiensis* que fueron aisladas de *S. lycopersicum*, al igual que *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Yasuhara-Bell & Alvarez, 2014), pero solamente ésta última es capaz de causar enfermedad en esta planta.

1.5 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) y el cancro bacteriano

Cmm es reconocida como el agente causal del cancro bacteriano del tomate, una enfermedad que fue descrita por primera vez en Michigan, E.E.U.U. en el año de 1910 por el fitopatólogo Erwin F. Smith. Aunque su hospedero es el tomate (*S. lycopersicum*), puede colonizar otras solanáceas como pimiento y berenjena (Sen et al., 2015). *Cmm* es una bacteria mesófila, su temperatura óptima de crecimiento oscila entre los 20 - 30°C. Su pH óptimo se encuentra entre 7 y 8; sin embargo, es capaz de crecer a pH 5.

En 2008, Gartemann y colaboradores publicaron la secuencia genómica de la cepa NCPPB 382, el primer genoma de *Cmm* secuenciado hasta la fecha. El tamaño del genoma de NCPPB 382 es de 3.298 Mb y tiene un alto contenido de (G + C) de 72.6%. El análisis del genoma reveló la existencia de una isla de patogenicidad (PAI por *pathogenicity island*) de aproximadamente 129 kb, con dos subregiones ricas en genes de proteasas y glicosidasas, *chp* y *tomA* (Fig. 2). Se confirmó también la presencia de dos plásmidos en *Cmm*, los denominados pCM1 (de 27.4 kb) y pCM2 (de 70 kb), en los cuales se encontraron algunos genes que han sido asociados a la patogenicidad y virulencia de este organismo.

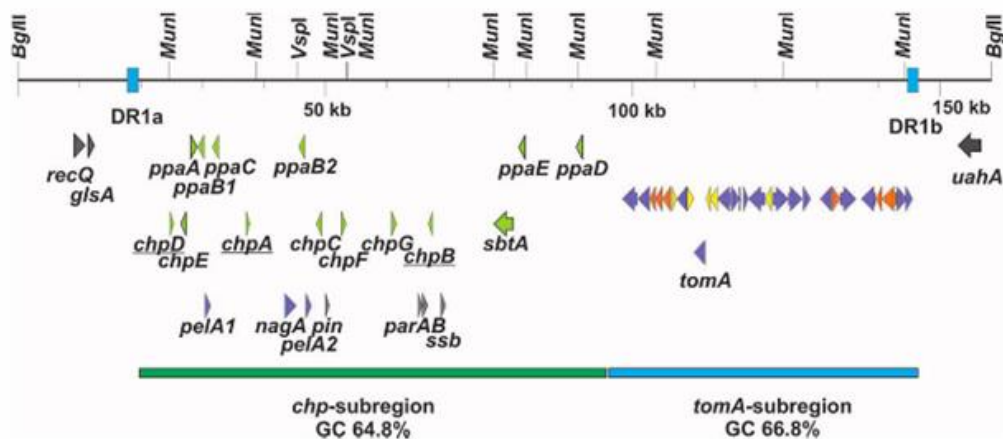


Figura 2. Esquema de la isla de patogenicidad (PAI) encontrada en NCPPB 382 (tomado de Gartemann et al., 2008). La PAI está dividida en dos subregiones: *chp* y *tomA*. La región *chp* se caracteriza por contener varias proteasas (flechas verdes) y la subregión *tomA* por tener alta cantidad de glicosidasas (flechas moradas). Las flechas amarillas y naranjas indican genes de reguladores y transportadores respectivamente.

1.5.1 Infección por *Cmm* y síntomas del cancro bacteriano

Cmm infecta al tomate principalmente a través de la semilla, aunque los restos vegetales en el suelo también pueden ser una fuente de infección. Prácticas agrícolas tales como el riego y la poda, o el contacto de herramientas o plantas infectadas con plantas sanas, pueden ocasionar infecciones secundarias a través de estomas, hidátodos, raíces o tejidos dañados (Eichenlaub, et al., 2006; Sen et al., 2015). Una vez dentro de la planta, *Cmm* coloniza el xilema y de ahí coloniza otros tejidos, como el fruto y la semilla (Tancos et al., 2013). La mortalidad por *Cmm* y el desarrollo de síntomas puede variar con la etapa fenológica (Sharabani et al., 2013), aunque hay reportes de plantas infectadas por *Cmm* de manera asintomática (Gitaitis et al., 1991). Estas observaciones sugieren que hay un factor necesario para que la infección por *Cmm* derive en el desarrollo del cancro bacteriano que podría estar relacionado con el estado fisiológico del hospedero, algo que a su vez está fuertemente influenciado por el lugar donde éste habita (Kuşçu et al., 2014; Nangare et al., 2016; Parvej et al., 2010).

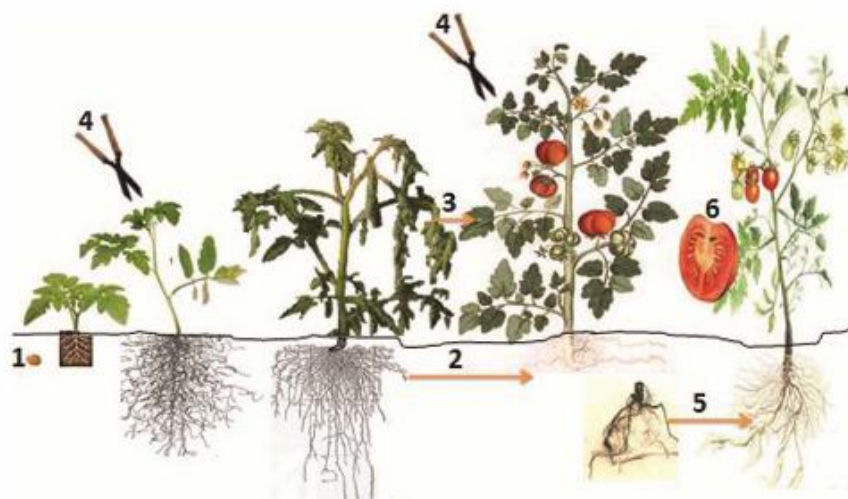


Figura 3. Ciclo y vías de infección por *Cmm* en *S. lycopersicum* (tomado de Sen et al., 2015). (1) Transmisión (primaria) por semillas infectadas; (2) transmisión secundaria por raíces; (3) contacto entre hojas; (4) prácticas agrícolas; (5) contacto con desechos infectados; y (6) inicio de un nuevo ciclo de infección por semillas provenientes de una planta infectada.

Uno de los primeros síntomas de la infección por *Cmm* es el marchitamiento unilateral de las hojas, observado principalmente en las hojas más cercanas al suelo. Si el fruto se infecta en etapas tempranas de su desarrollo, se pueden desarrollar lesiones negras rodeadas de un halo negro conocidas como “ojo de pájaro”. A partir de este punto, áreas de tejido muerto, denominadas cancras¹ comienzan a aparecer en los peciolo y tallos. Uno de los síntomas más evidentes es la necrosis interna de los tallos conocida como la “decoloración del tallo”. Las últimas etapas de la infección dan lugar al marchitamiento de toda la planta y su eventual muerte (Sen et al., 2015).

1.6 Elementos funcionales asociados al desarrollo del cancro bacteriano

La mayor parte de los elementos funcionales de carácter molecular que han sido vinculados con la capacidad de *Cmm* para producir la enfermedad en tomate pueden ser clasificados dentro de dos grupos: el de las proteasas y el de las CAZymes (del inglés *Carbohydrate-Active enZymes*, enzimas activas en carbohidratos). Estos dos tipos de elementos resultan particularmente relevantes para el desarrollo de esta tesis, por lo que se describen más adelante. En un tercer grupo se pueden agrupar otros elementos que no entran dentro de ninguno de los grupos anteriores, tales como reguladores de la transcripción (Savidor et al., 2014) y los exopolisacáridos o EPS (Berpohl et al., 1996).

En elementos del tipo proteasa y CAZymes se encontraron péptidos señal de secreción (Dreier et al., 1997; Jahr et al., 2000; Stork et al., 2008). Además de las vías comunes de secreción de bacterias, la vía general de secreción (Sec) y de traslocación de argininas gemelas (Tat), es común que organismos patógenos empleen mecanismos especiales de secreción para transportar moléculas que les permitan prosperar en sus hospederos (Chang et al., 2014). Sin embargo, no se encontraron mecanismos de secreción especial codificados

¹ Debido a una incorrecta traducción del inglés de la palabra para denominar a este síntoma, *canker*, también se le conoce a la enfermedad provocada por *Cmm* como “cáncer bacteriano”.

en el genoma de *Cmm* (Gartemann et al., 2008), por lo que parece más probable que *Cmm* solamente emplee las vías Sec y Tat.

1.6.1 Proteasas

Dentro de los elementos tipo proteasas podemos encontrar proteínas codificadas dentro del plásmido pCM2, tales como la serin-proteasa Pat-1 (Dreier et al., 1997). Análisis de mutación por delección y complementación identificaron a este elemento como un factor importante para la virulencia en *Cmm*. Además de Pat-1, también codificados en pCM2, se encuentran dos homólogos de esta proteína, denominados PhpA y PhpB (Eichenlaub & Gartemann, 2011).

Dentro de la subregión *chpA* de la PAI se encuentran codificadas principalmente proteínas del tipo serin proteasas, tales como los homólogos de Pat-1, ChpA-G, las serin proteasas de la familia Ppa, PpaA, B1, B2, C, D y E, además de la subtilasa SbtA. Los genes de ChpA, B y D son considerados no funcionales, debido a que poseen cambios en el marco de lectura, haciéndolos parecer más cercanos a pseudogenes. De todos los genes en la PAI, hasta ahora, sólo se cuenta con evidencia que sugiere que ChpC, StbA y PpC podrían estar involucrados en la colonización del hospedero por *Cmm*.

1.6.2 CAZymes

Las CAZymes son enzimas involucradas en la síntesis y degradación de carbohidratos complejos. Las CAZymes se clasifican dentro de 6 grandes grupos: glicosil transferasas (GT), glicósido hidrolasas (GH), polisacárido liasas (PL), carbohidrato esterasas (CE), actividad auxiliar (AA) y módulos de unión a carbohidratos (CBM, por el inglés *Carbohydrate-Binding Module*) (Lombard et al., 2014).

1.6.2.1 PCWDE

De las familias de CAZymes, algunas han sido clasificadas a su vez en un conjunto denominado PCWDE (del inglés *Plant Cell Wall Degrading Enzymes*, enzimas degradadoras de la pared celular de plantas). En este sub-grupo se encuentran enzimas de los tipos GH, PL y CE, cuya actividad degradadora de alguno de los componentes de la pared celular de las plantas ha sido previamente reportada (Kubicek et al., 2014). En organismos que causan enfermedades vasculares, tales como *Cmm*, las PCWDE juegan un papel importante (Bae et al., 2015).

Hace algunas décadas se lograron identificar algunas enzimas extracelulares con actividad degradadora de pared celular (Beimen et al., 1992; Meletzus et al., 1993) e incluso se ha estudiado el papel de una de ellas en la patogenicidad de *Cmm*: CelA, una endo- β -1,4-glucanasa codificada en el plásmido pCM1 (Jahr et al., 2000). Algunos síntomas de la infección por *Cmm*, tales como el marchitamiento de las plantas, podrían explicarse como el resultado de la actividad de estas enzimas en la degradación del tejido del xilema. La degradación del xilema no sólo lleva a la liberación de nutrientes que pueden ser aprovechados por *Cmm*, sino también puede llevar a la dispersión de la bacteria fuera del xilema y la posterior colonización del resto de la planta.

1.6.2.2 Otras CAZymes

En la región *tomA* de la PAI se encuentra el gen homónimo que codifica una proteína llamada tomatinasa. TomA es una enzima capaz de degradar a la α -tomatina, un metabolito de especialidad que forma parte de las defensas del tomate y que reduce las poblaciones de hongos (Roldán-Arjona et al., 1999) y bacterias (Seipke & Loria, 2008). Parece ser que la función de *tomA* no es esencial para la virulencia, ya que cepas mutantes de este gen mostraron una virulencia idéntica a la de sus contrapartes sin mutación (Kaup et al., 2005), por lo que su función probablemente esté asociada a la colonización del hospedero.

1.6.3 Otros elementos asociados al desarrollo del cancro bacteriano

Los exopolisacáridos o EPS son mezclas complejas de biopolímeros, que además de polisacáridos, incluyen proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y sustancias húmicas. Éstos permiten a algunas bacterias adherirse a ciertos sustratos y ofrecen protección contra estreses medioambientales como la deshidratación (Vu et al., 2009). En algunos casos, incluso se les ha llegado a relacionar con el desarrollo de enfermedades relacionadas con fitopatógenos (de Pinto et al., 2003).

Dado que *Cmm* es capaz de producir colonias mucoides que producen estos compuestos, se ha propuesto que los EPS tienen un rol en la virulencia. Sin embargo, no se encontró diferencia en mutantes que producían una cantidad menor de EPS o con una composición distinta, en tanto a la virulencia o al desarrollo de la enfermedad, en comparación con cepas silvestres (Bermppohl et al., 1996), por lo que se descartó el papel de los EPS en la virulencia. Una idea del rol que juegan los EPS en la patogenicidad es la de participar en la colonización de la planta, proveyendo de un *biofilm* protector a las bacterias (Flügel et al., 2012).

Estudios recientes indican que varios de los elementos moleculares ligados a la patogenicidad en *Cmm* se encuentran regulados por los factores de transcripción denominados Vatr1 y Vatr2. Interesantemente, algunos clusters de genes biosintéticos también se encuentran regulados por éstos (Savidor et al., 2014), uno de los cuales es, interesantemente, un sideróforo. Se sabe que estos metabolitos de especialidad son utilizados por organismos patógenos para secuestrar moléculas de hierro de sus hospederos y, en algunos casos, son necesarios para la expresión de factores de virulencia (Franza & Expert, 2013; Haas et al., 2008). Sin embargo, no se sabe a ciencia cierta el papel que juegan estas moléculas en el estilo de vida de *Cmm* o si tienen un papel en el desarrollo del cancro bacteriano.

2. ANTECEDENTES

2.1 Análisis genómicos de *Clavibacter spp.*

La publicación del primer genoma de *Cmm* fue acompañada con la del primer genoma de *C. sepedonicus* (Bentley et al., 2008). Dado que ambos genomas se obtuvieron aproximadamente al mismo tiempo, por primera vez se tuvo la oportunidad de analizar y comparar los genomas de bacterias de este género. Esto permitió obtener información valiosa para la identificación de caracteres fundamentales para la patogenicidad en estos organismos, así como para la evolución de la especificidad de hospedero. Dentro de éstos destacan particularmente aquellos elementos funcionales introducidos previamente (sección 1.6) Análisis subsiguientes de genómica comparativa a nivel de género (Tambong, 2017) revelaron características compartidas entre cinco de las especies conocidas, entre las cuales destaca una mayor abundancia de genes implicados en el metabolismo y transporte de carbohidratos en comparación con otras funciones.

Desde un punto de vista de genómica comparativa, Thapa y colaboradores (2017) reportaron análisis a nivel de género, enfocándose en *Cmm* y otros aislados de *Clavibacter* obtenidos de plantas de tomate provenientes todas de California, EE.UU. Al igual que en el análisis genómico de Tambong (2017), estos autores encontraron que los genes implicados en el metabolismo de carbohidratos, o CAZymes, eran abundantes en el genoma de estas bacterias, especialmente en *Cmm*, incluso si solamente se tomaba en cuenta tipos de CAZymes clasificados dentro del grupo de PCWDE. Más aún, al predecir y analizar las proteínas que son secretadas por las vías generales de secreción (Sec) y de translocación de argininas gemelas (Tat), se encontró que muchas de las proteínas identificadas eran CAZymes (Sec y Tat) y algunas proteasas (Sec).

2.2 Diversidad genética en *Cmm*

La genotipificación de las poblaciones de *Cmm* alrededor del mundo indican que éstas, en general, son muy variables (Croce et al., 2016; Kleitman et al., 2008; Milijašević-Marčić et al., 2012; Tancos et al., 2015; Wassermann et al., 2017); aunque algunas poblaciones muestran mediana o poca variabilidad (Kawaguchi et al., 2010; Valenzuela et al., 2018), lo que podría deberse a un origen común, como por ejemplo, el proveedor de la semilla. De hecho, un número importante de estas poblaciones comparten características genotípicas con poblaciones provenientes de otros países de donde fueron aisladas, lo que indica no sólo orígenes comunes, sino también un constante flujo de las cepas entre países.

2.3 Variación en la capacidad de patogenicidad y virulencia

En algunos casos, se han encontrado cepas en las que ciertos genes relacionados con la patogenicidad no se encuentran presentes, especialmente aquellos codificados en plásmidos. Los efectos de la ausencia de estos elementos son variados: muchas veces, congruente con la idea de la importancia de éstos para la patogenicidad de *Cmm*, la virulencia se ve disminuida (Bella et al., 2012; Kleitman et al., 2008) . En otros casos, no se reporta una aparente disminución de la capacidad de *Cmm* para causar enfermedad, lo cual parece indicar que la aportación de estos elementos en el papel de *Cmm* como patógeno es dependiente de la cepa (Jacques et al., 2012; Tancos et al., 2015; Thapa et al., 2017) .

2.4 Observaciones de campo

El laboratorio de Evolución de la Diversidad Metabólica ha realizado un monitoreo de brotes de cancro bacteriano en México desde el año 2010 hasta la fecha, principalmente enfocado al diagnóstico de esta enfermedad mediante métodos moleculares. Durante dicho periodo, se han realizado varias observaciones que han llamado la atención, respecto al desarrollo de la enfermedad por *Cmm*: 1) la aparición de la enfermedad está mayormente asociada a variedades de *S. lycopersicum* cultivadas en invernaderos; en este sentido, aunque en un inicio los brotes se limitaban a unas pocas variedades, en los últimos años han surgido casos en variedades donde no se solía ver la enfermedad; 2) hay algunos géneros bacterianos como *Microbacterium*, *Curtobacterium* o *Micrococcus*, que se encuentran dentro del orden *Micrococcales*, en los que se han detectado algunos de los factores de patogenicidad previamente identificados en *Cmm*, lo que sugiere un papel de la comunidad en el desarrollo de síntomas, y 3) en experimentos con plantas de *S. lycopersicum* inoculadas con cepas de *Cmm* se ha observado que algunas de las plantas no desarrollan síntomas (Rodríguez Orduña, 2016) lo que es congruente con el aislamiento de *Cmm* de plantas asintomáticas. En ambos casos, la principal diferencia entre las plantas se atribuyó a la ubicación, lo que podría indicar la influencia del ambiente en el que crece el hospedero en el desarrollo de la enfermedad.

Lo anterior es congruente con el hecho de que los brotes de cancro bacteriano pueden ser repentinos. *Cmm* puede permanecer por periodos de latencia en plantas que no presentan síntomas (Eichenlaub et al., 2006). Se piensa que los mecanismos relacionados con el *quorum sensing* podrían ser detonantes en la expresión de factores de virulencia (Sen et al., 2015). También es factible que factores abióticos como altas temperaturas, fluctuaciones en la temperatura o alta humedad, así como el estrés generado por una alta carga de frutos en las plantas, pudiesen inducir la aparición de brotes (O'Neill & Mayne, 2014). En conjunto, la información disponible sugiere que *Cmm* tiene un comportamiento de tipo anfibionte, el cual está influenciado por una combinación de factores ambientales (como indican las observaciones en campo), tanto como geno/fenotípicos asociados al desarrollo de síntomas de cancro bacteriano (como indican las observaciones en las poblaciones alrededor del mundo).

5. HIPÓTESIS

Clavibacter michiganensis tiene una naturaleza anfibionte (patógeno-no patógeno) fundamentada en la combinación de rasgos genotípicos-fenotípicos-ambientales, que se pueden reconocer mediante análisis de filogenómica y genómica comparativa.

6. OBJETIVO PRINCIPAL

Expandir y clasificar mediante criterios evolutivos, taxonómicos, y otros, la base de datos genómica de *Clavibacter* y organismos relacionados, y vincular esta clasificación a rasgos funcionales y medioambientales en casos selectos, arrojando luz al entendimiento de la enfermedad del cancro bacteriano.

6.1 Objetivos específicos

1. Expandir la base de datos genómica de *C. michiganensis* (incluyendo a otros organismos relacionados del orden *Micrococcales*), con aislados provenientes de plantas sanas y enfermas que crezcan en contextos ecológicos distintos. Incluir dentro de éstos tanto plantas de tomate silvestre como de tomate criollo en condiciones agrícolas.
2. Clasificar mediante genómica comparativa los elementos de la base de datos, de acuerdo con rasgos funcionales que sugieran la adopción de una estrategia de vida; considerando, además, criterios taxonómicos, evolutivos y ecológicos.
3. Caracterizar los grupos más contrastantes con base en la clasificación de rasgos funcionales, con el fin de observar si éstos tienen una correlación con el fenotipo.

7. METODOLOGÍA

7.1 Aislamiento de cepas bacterianas

Tejidos de tallos, hojas, frutos y flores obtenidos de plantas de *S. lycopersicum* muestreadas en campo fueron colocados directamente en cajas Petri conenteniendo el medio semi-selectivo CMM1: 10.0 g sacarosa, 1.2 g Tris base cristalizado, 250 mg MgSO₄·7H₂O, 5.0 g cloruro de litio, 2.0 g extracto de levadura, 1.0 g NH₄Cl, 4.0 g casaminoácidos y 15.0 g de agar por litro. El medio se suplementó con antibióticos filtrados después de esterilizar el medio en una autoclave, a las siguientes concentraciones: 28 mg/l ácido nalidíxico, 10 mg/l sulfato de polimixina y 200 mg/l cicloheximida, e incubados a 30°C. Se monitoreó el crecimiento bacteriano por los siguientes 3-7 días. Se seleccionaron las colonias bacterianas de acuerdo con su morfología; fueron priorizadas aquellas con morfología similar a la reportada para *Cmm* (OEPP/EPPO Bulletin, 2016).

7.2 Identificación de cepas bacterianas

El ADN genómico bacteriano fue obtenido de los aislados bacterianos a partir de cultivos en medio LB líquido, mediante una extracción con fenol-cloroformo y precipitación con etanol. Se amplificó la subunidad 16S del gene rRNA utilizando los primers universales para bacterias F27 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y R1492 (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Las reacciones de PCR (100 µl) contenían 1X Kapa Taq Buffer A con Mg (Kapa Biosystems), 10% DMSO, 10µM de cada dNTP, 10µM de cada primer y 0.4µl de Kapa Taq Polimerasa a 5U/µl (Kapa Biosystems). Se añadieron ~400 ng de ADN a cada reacción. La reacción fue llevada a cabo precalentando a 95°C por 5 min; seguido de 35 ciclos de 95°C por 45 s, 55°C por 45 s y 72°C por 2 min y finalizando con la extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron purificados utilizando EXPIN PCR SV kit (Gene All ® Biotechnology) o PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen) para luego ser secuenciados en el Laboratorio de Servicios Genómicos (LABSERGEN) en LANGEBIO. Las secuencias sentido y antisentido del 16S rRNA fueron ensambladas en un consenso mediante el Staden Package (Staden et al., 1998). La identificación taxonómica fue determinada comparando las secuencias ensambladas contra la base de datos ribosomal de la Universidad de Michigan (Cole et al., 2014) y a la base de datos del proyecto SILVA (Quast et al., 2013). En ciertos casos se empleó el marcador específico del género *Clavibacter*, desarrollado en el EvoDivMet. (*Forward* 5'-ACGATGTTGTAGCCGACGA-3'; *Reverse* 5'-GACACCGAGATCGTGAAGT-3'). Las reacciones de PCR (25 µl) contenían 1X Kapa Taq Buffer A con Mg (Kapa Biosystems), 10% DMSO, 10µM de cada dNTP, 10µM de cada primer y 0.1µl de Kapa Taq Polimerasa a 5U/µl (Kapa Biosystems). Se añadieron ~100 ng de ADN a cada reacción. La reacción fue llevada a cabo precalentando a 95°C por 5 min; seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 61°C por 30 s y 72°C por 1 min y finalizando con la extensión final a 72°C por 10 min.

Para los análisis de similitud de genoma por alineamiento ANI (Average Nucleotide Identity) y dDDH (digital DNA-DNA hybridization), se emplearon herramientas de plataformas en línea. Para el ANI (Kostas' Lab; <http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/>) y para el dDDH (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>)

7.3 Secuenciación

Los genomas de las cepas seleccionadas fueron secuenciados utilizando la plataforma MiSeq de Illumina disponible en el LABSERGEN. Las secuencias de baja calidad en los *reads* obtenidos fueron eliminadas utilizando el software Trimmomatic v0.36 (Bolger et al., 2014) y posteriormente fueron ensambladas utilizando el servicio de ensamblado de genomas disponible en el sitio de PATRIC (Wattam et al., 2017).

7.4 Construcción de la base de datos genómica

La base de datos genómica fue construida con los genomas de cepas de los géneros *Clavibacter*, *Agreia*, *Curtobacterium*, *Microbacterium* y *Micrococcus* obtenidos en este trabajo, de la colección de nuestro laboratorio, compartidos por otros grupos de trabajo y genomas disponibles en la base de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Se realizó una selección de los genomas con base en el estadístico N50 (valor de corte ≥ 24000). Todos los genomas seleccionados fueron anotados utilizando la plataforma de RAST (Aziz et al., 2008).

7.5 Reconstrucciones filogenómicas

Se realizaron dos reconstrucciones filogenómicas. Para la primera, se emplearon todos los genomas del género *Clavibacter* y uno de *Agreia*, el cual se utilizó como *outgroup* debido a que, de los géneros presentes en la base de datos genómica es el más cercano a *Clavibacter* (Nouioui et al., 2018). En el caso de la segunda, se emplearon únicamente genomas de *Cmm* y, como *outgroup*, una cepa cercana a la especie (LMG 26808), lo cual fue decidido con base en la primera reconstrucción. En ambos casos, se extrajeron las secuencias de aminoácidos de genes homólogos presentes en todos los genomas (361 secuencias en la primera y 451 en la segunda), las cuales fueron alineadas mediante el programa MUSCLE v3.8 (Edgar, 2004). A partir de los alineamientos se obtuvieron bloques conservados de aminoácidos utilizando Gblocks 0.91b (Castresana, 2000), los cuales fueron concatenados en una matriz la cual se empleó para la construcción del árbol filogenómico en MrBayes 3.2.3 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist et al., 2012). El soporte de las ramas fue medido como probabilidad posterior.

7.6 Análisis filogenómico con énfasis funcional

Partiendo de la literatura, se definieron los elementos funcionales de mayor importancia para el análisis genómico de *Clavibacter* y otras bacterias pertenecientes al orden *Micrococcales*. Dentro de éstos se seleccionaron las CAZymes y las Proteasas, las cuales tienen en común péptidos señal para distintos mecanismos de traslocación.

7.6.1 Búsqueda de CAZymes y proteasas

Se realizó una búsqueda en las secuencias de aminoácidos de cada genoma, mediante la herramienta *hmmsearch* del paquete HMMER 3.1b1 (Eddy, 2009, 2011; Eddy, 1998). Para el caso de las CAZymes, se utilizó la versión 7 de la base de datos HMM de dominios de CAZymes de dbCAN (Yin et al., 2012; Zhang et al., 2018). En el caso de las proteasas, la base de datos HMM fue construida a partir de la biblioteca de secuencias no redundantes de unidades de proteasas, disponible en la base de datos de MEROPS (Rawlings et al., 2018). Para determinar cuáles proteínas eran secretadas por la vía general de secreción (Sec) y la

vía de translocación de argininas gemelas (Twin-Arginine), se buscó la presencia de péptidos señal en las secuencias de proteínas empleando los programas SignalP 4.1 (Petersen et al., 2011) y TatP 1.0 (Bendtsen et al., 2005).

7.6.2 Clasificación y anotación funcional de enzimas

Las secuencias de proteasas y PCWDE halladas en los genomas analizados fueron agrupadas por familias de homólogos empleando FastOrtho, una reimplementación de OrthoMCL (Li et al., 2003), con los parámetros *default*. La búsqueda de proteasas y PCWDE por HMMR también proveyó del tipo de proteasa o PCWDE al que pertenecía cada proteína encontrada. Se buscó en las bases de datos de MEROPS y dbCAN la función asociada al tipo. También se compararon las secuencias de proteínas contra la base de datos del NCBI mediante BlastP.

8. RESULTADOS

8.1 Incremento de la base de datos genómica

Durante casi una década nuestro laboratorio ha llevado a cabo un monitoreo de brotes de cancro bacteriano en varias partes del país. Lo que tuvo como resultado el aislamiento de varias cepas de *Cmm* de distintos sitios y la obtención del genoma de varias de éstas. A partir de éstos, se ensambló una base de datos genómica, la cual se complementó con genomas públicos de *Clavibacter*, varios de los cuales corresponden a especies distintas a *Cmm* (*C. capsici*, *C. tessellarius*, *C. insidiosus*, *C. nebraskensis*) y cepas de *Clavibacter* sin asignación taxonómica más allá del género. Sin embargo, todas las cepas colectadas durante el monitoreo realizado por nuestro laboratorio provenían de plantas de *S. lycopersicum* de variedades comerciales, crecidas en invernaderos de alta tecnología y, aunque los datos disponibles son más escasos, es probable que los genomas públicos provengan también de cepas obtenidas de agroecosistemas o estén ligadas a éstos.

De acuerdo con el modelo de coevolución de Thrall et al. (2007), ambientes como los invernaderos de alta tecnología pueden ser clasificados como de alta calidad ambiental, debido a la alta disponibilidad de nutrientes con los que cuentan las plantas y la minimización de la influencia de factores bióticos o abióticos. Además, la diversidad de especies tanto macro como microscópicas suele ser menor en estos agroecosistemas. Por lo que un invernadero también puede ser considerado como un ambiente de complejidad biótica baja. Con estos dos supuestos en consideración, el posible número de interacciones patogénicas-parasíticas dentro un invernadero es alto.

Bajo la lógica del modelo, la colecta de muestras de plantas de ambientes similares (es decir, otros invernaderos) tendría como resultado el aislamiento de bacterias con un perfil biológico similar a aquellas que ya se encontraban en la colección, presumiblemente patogénico. Para los fines del análisis filogenómico, era importante, por ende, enriquecer el conjunto de genomas disponibles con cepas que, aunque cercanas taxonómicamente, fueran suficientemente distintas; por ejemplo, en términos de su nicho ecológico y estilos de vida (Ho et al., 2017). Siendo México uno de los centros de domesticación de *S. lycopersicum* (Bergougnoux, 2014), en nuestro país existen variedades que se consideran como estadios intermedios en la domesticación de este cultivo (Blanca et al., 2012), creciendo en estado silvestre. Esto significa que estas plantas crecen en un ambiente en el extremo opuesto del espectro al invernadero; es decir, un medio con calidad ambiental baja y de alta complejidad biótica. Dado que *S. lycopersicum* es el hospedero de *Cmm*, la colecta de variedades en estado silvestre prometía la posibilidad del aislamiento de cepas de ambientes distintos al invernadero, u otros sistemas agroecológicos, y la obtención de genomas para enriquecer la base de datos genómica de *Clavibacter*.

8.1.1 Colecta de plantas silvestres en la búsqueda de cepas de *Clavibacter*

Con el fin de obtener aislados de bacterias del género *Clavibacter* de plantas de agroecosistemas distintos a los invernaderos de alta tecnología, se colectaron individuos en estado silvestre de *S. lycopersicum*. Ya que hay reportes de la capacidad de estas bacterias para colonizar plantas cercanas filogenéticamente a *S. lycopersicum* (Thyr et al., 1975), cuando se hallaban individuos de la misma subfamilia (*Solanoideae*) en las cercanías de plantas de *S. lycopersicum* colectadas, también se colectaron muestras de aquellos. En total,

se obtuvieron 39 muestras de individuos distintos, los cuales fueron obtenidos principalmente de los estados de Guanajuato y Jalisco (Tabla suplementaria 1). El tejido de estas muestras vegetales fue procesado para obtener aislados bacterianos, como se describe en los métodos.

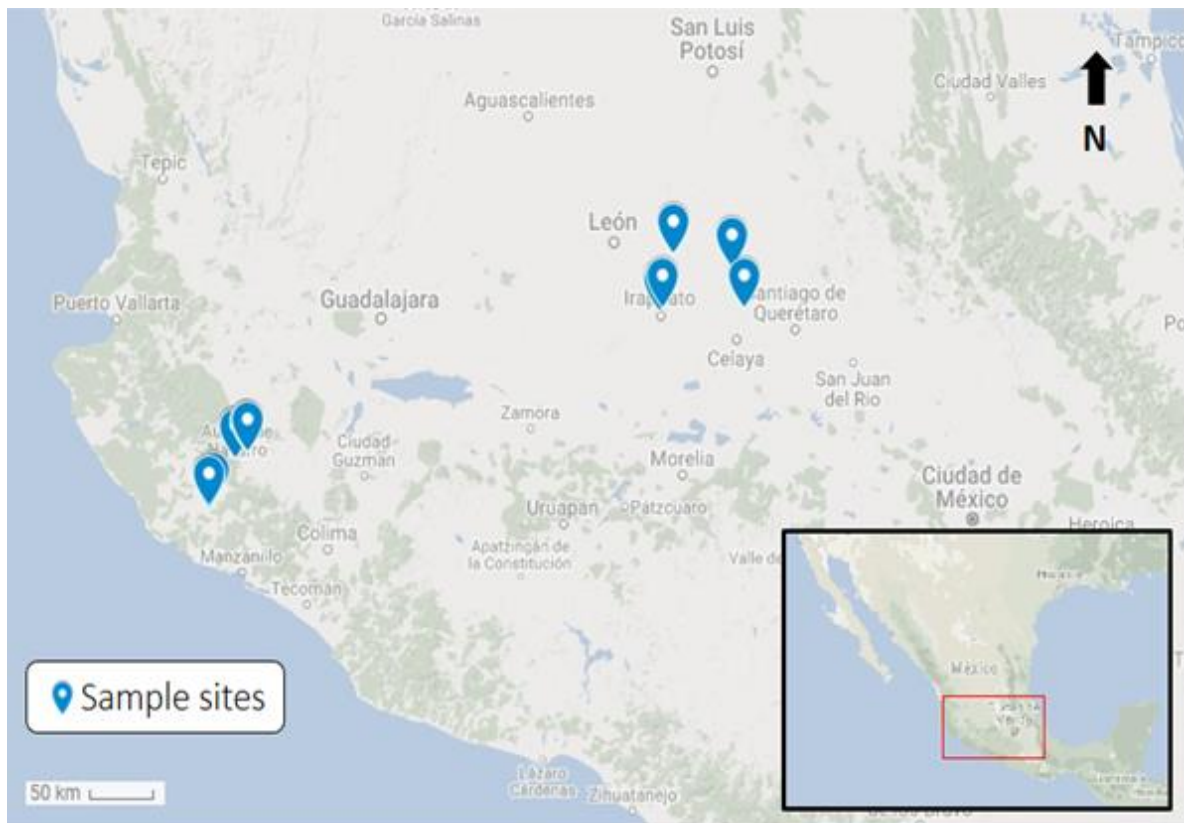


Figura 4. Localización de los sitios de muestreo de plantas para la obtención de aislados de *Clavibacter*. Las muestras se obtuvieron principalmente en los estados de Guanajuato y Jalisco de sitios donde se ha reportado la existencia de plantas silvestres de *Solanum lycopersicum* y otras plantas de la subfamilia *Solanoideae*.

8.1.2 Identificación de las cepas aisladas y aislamiento de RA1B, una cepa de *Clavibacter* obtenida de una planta silvestre

Se obtuvieron 275 aislados de las plantas muestreadas (Tabla suplementaria 2), de los cuales 214 se pudieron identificar hasta nivel de género, según análisis de su subunidad 16S del gen rRNA (Fig. 5). De los 214 aislados identificados, 209 corresponden a bacterias clasificadas dentro del orden *Micrococcales*; de éstas, únicamente una pertenece al género *Clavibacter*. Esta cepa fue aislada de una planta de *S. lycopersicum* en la que no se apreciaban síntomas de enfermedad. Se secuenciaron los genomas de esta cepa (denominada RA1B) y las cepas que fueron aisladas con ésta (RA1A y RA1C) que pertenecen al género *Microbacterium*. En el caso de los 61 aislados restantes no se logró la identificación mediante el análisis de la secuencia de la subunidad 16S del gen rRNA o no se realizó. Por ello, se utilizó un marcador específico del género *Clavibacter* para determinar si pertenecían a este género. Sin embargo, ninguna de las cepas arrojó un resultado positivo para este marcador.

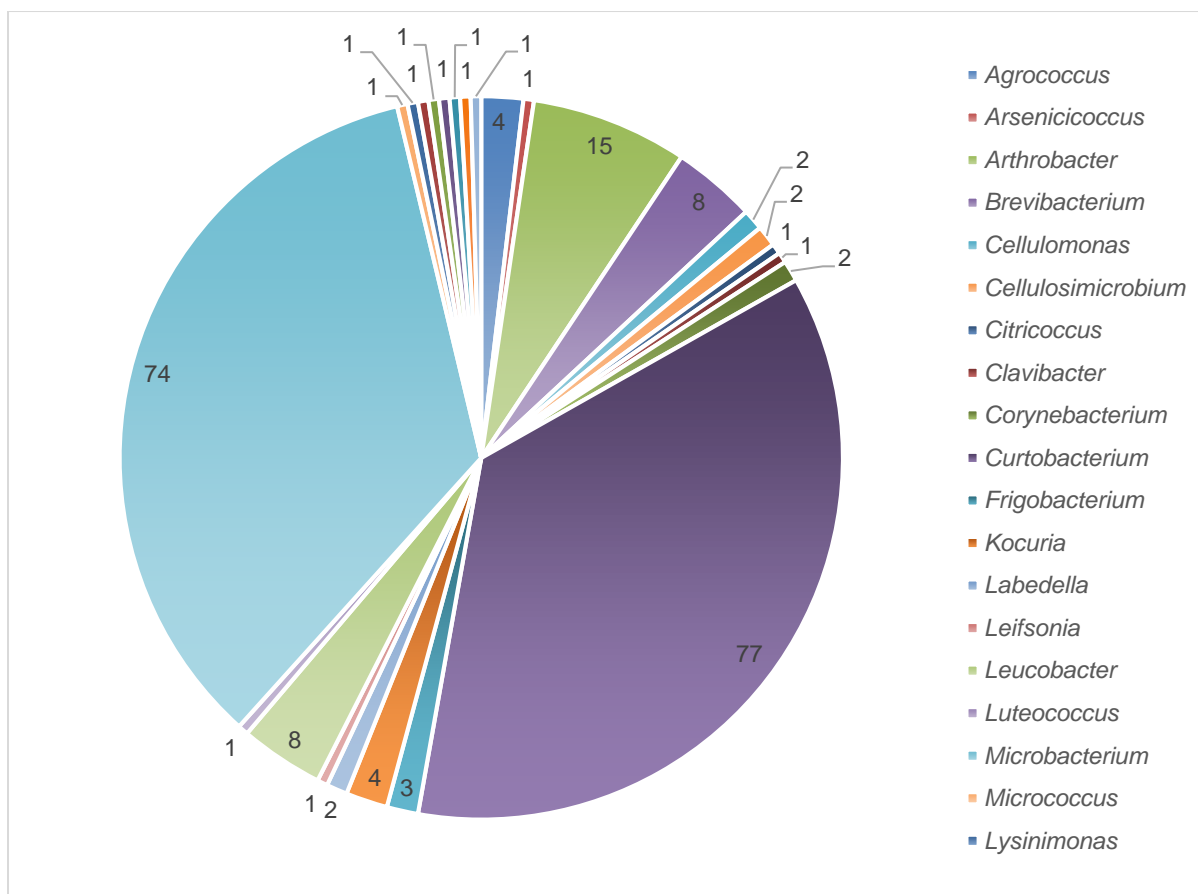


Figura 5. Aislados bacterianos identificados mediante el análisis de la subunidad 16S del gen rRNA. La porción del gráfico corresponde al número de aislados identificados por cada género. El número de aislados por género se muestra en los números dentro de cada porción. Los géneros a los que pertenecen los aislados se indican en la parte derecha.

8.1.3 Ensamble final de la base de datos genómica

Los genomas obtenidos fueron conjuntados con los genomas de *Clavibacter* de la colección de nuestro laboratorio, con genomas compartidos por el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la Universidad Técnica Federico Santa María en Valparaíso, Chile y con genomas disponibles públicamente en el NCBI, algunos de los cuales fueron publicados durante el desarrollo de este trabajo. Adicionalmente, se añadieron genomas de otros géneros dentro del orden *Micrococcales* tanto privados como públicos (*Agreia*, *Curtobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*), por su cercanía taxonómica y, en algunos casos, por su coaislamiento con cepas de *Cmm* y posible implicación en el fenómeno del cancro bacteriano. Análisis preliminares, como los descritos en la subsección 7.6, mostraron ser sensibles a la calidad de los genomas empleados, por lo que se realizaron evaluaciones de calidad tomando como parámetro de medición el estadístico N50. Se estableció como corte un valor mayor o igual a 24000 para la selección final de genomas. Al final, fueron seleccionados 121 genomas (102 de *Clavibacter*, 19 de otros géneros; 75 privados y 46 públicos) para componer la base de datos (Tabla suplementaria 3).

8.2 Análisis filogenómicos

8.2.1 Reconstrucción filogenómica de *Clavibacter*: ¿Cómo se relacionan las cepas de *Clavibacter*?

Para comprender la relación de RA1B con el resto de las cepas de *Clavibacter* conocidas, incluidas en la base de datos descrita en la subsección 8.1, y establecer un marco para los análisis subsecuentes, se procedió a la reconstrucción filogenómica de los microorganismos seleccionados. El resultado de esta reconstrucción Bayesiana se muestra en la Fig. 6.

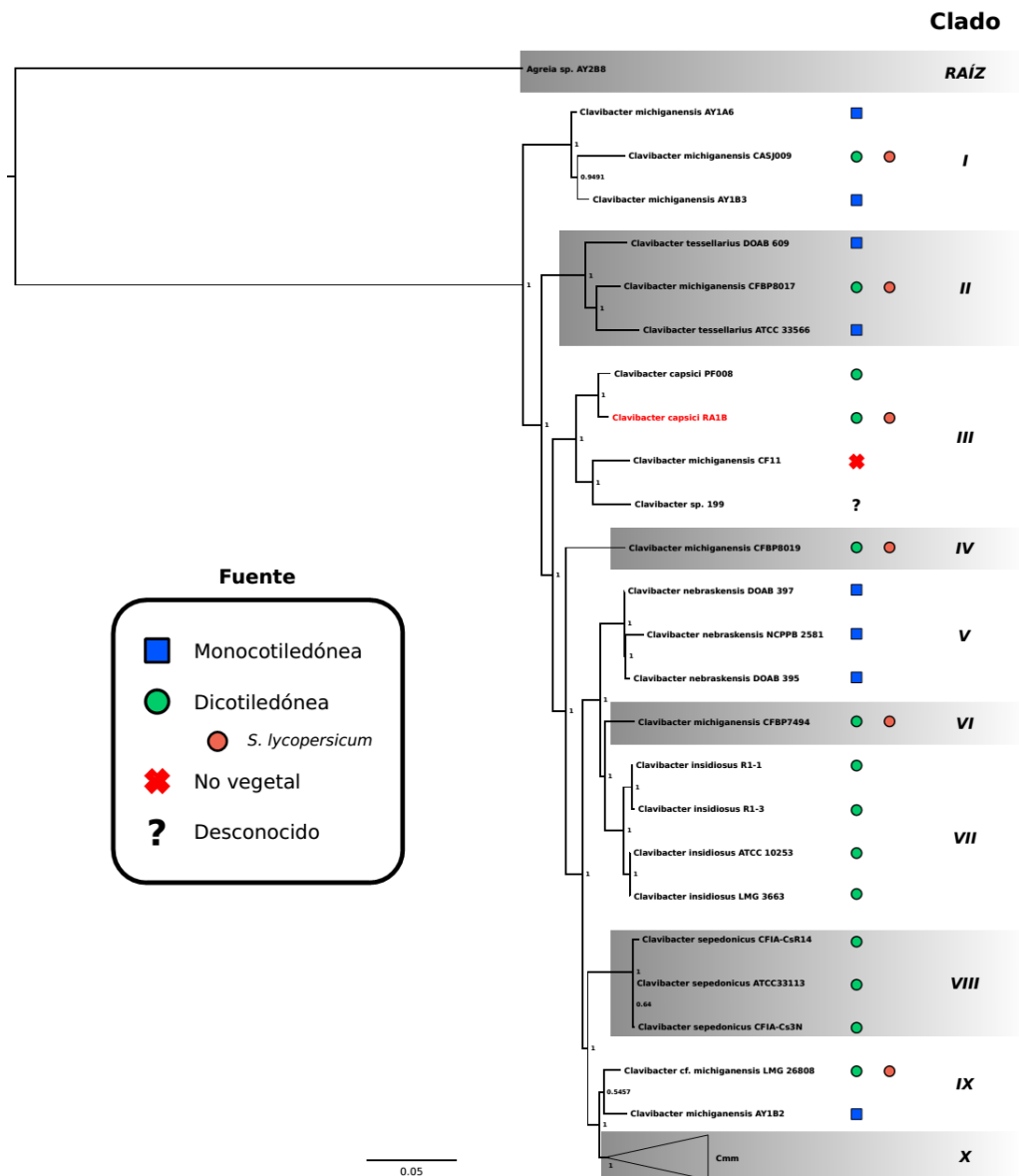


Figura 6 Árbol filogenético del género *Clavibacter*. La cepa RA1B aislada de *S. lycopersicum* se muestra en rojo. El clado colapsado corresponde a los genomas de cepas de *Cmm*. Se asignó una clave (números I-X) a cada clado. A la derecha de los nombres de las cepas se indica el tipo de planta de las que fueron aisladas. En el caso de las dicotiledóneas se indica, además, cuando se trata de *S. lycopersicum*. El soporte de las ramas se muestra como probabilidad posterior.

Las especies capaces de producir enfermedad en plantas monocotiledóneas (*C. tessellarius*, clado I; *C. nebraskensis*, clado V) no parecen compartir ancestros recientes en común, al igual que varias de las especies que producen enfermedad en dicotiledóneas (*C. capsici*, clado II; *C. insidiosus*, clado VII; *Cmm*, clado X). Es decir, no parece haber una relación entre la capacidad de producir enfermedad en plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas y el orden en el que los clados divergieron de sus ancestros comunes. Por otra parte, se observan clados donde se agrupan cepas aisladas tanto de monocotiledóneas como de dicotiledóneas (clados I y IX).

Interesantemente, varias de las cepas, que al igual que *Cmm* y RA1B han sido aisladas de *S. lycopersicum*, se encuentran dispersas entre varios clados (I, II, III, IV, VI, IX). Sin embargo, fuera de *Cmm*, en ninguna se ha reportado la capacidad de causar enfermedad en esta planta (Thapa et al., 2017; Zaluga et al., 2013). En el caso de la cepa CFBP8017, se ha demostrado que causa síntomas de enfermedad en *Triticum aestivum* (Thapa et al., 2017) y su posición entre dos cepas de *C. tessellarius* en esta filogenia sugiere que se trata de una cepa más de esta especie que, sin embargo, se encontró dentro de *S. lycopersicum*.

La cepa RA1B se agrupó en el mismo clado (III) que la cepa PF008 de *C. capsici*. Se realizaron análisis de similitud de genoma por alineamiento ANI y dDDH para identificar con precisión la identidad de la cepa de RA1B (Tabla 1). Se emplearon las cepas PF008 de *C. capsici* y NCPPB 382 de *Cmm* para la comparación. Tanto el ANI (>95%) como el dDDH (>70%) indican que la cepa aislada indudablemente pertenece a la especie *C. capsici*. La comparación con otras especies no arrojó valores de mayor magnitud (datos no mostrados).

Tabla 1 Características generales del genoma de RA1B. Se muestran los resultados del ANI y dDDH con cepas tipo de *Cmm* (NCPB 382) y *C. capsici* (PF008).

Cepa	RA1B
Tamaño del genoma	3.027 Mb
No. genes	2748
(G + C)	73.5 %
ANI <i>Cmm</i>	90.91
ANI <i>C. capsici</i> PF008	98.97
dDDH <i>Cmm</i>	4.72
dDDH <i>C. capsici</i> PF008	96.21

Dado que el árbol de la Fig. 6 carece de buena resolución dentro del clado de *Cmm* (X), se realizó un segundo árbol (Fig. 7A) para definir con mayor claridad las relaciones entre las cepas dentro de este clado. Para este fin, se empleó como raíz la cepa LMG 26808, que se encuentra en el clado inmediatamente más cercano (IX).

Antes de refinar la base de datos genómica con el criterio de corte basado en el valor del N50, las reconstrucciones filogenómicas de *Cmm* mostraban la presencia de un clado que indicaba una expansión poblacional. Sin embargo, en los análisis subsecuentes (subsección X) basados en la búsqueda y agrupación de secuencias por su homología se encontró que

algunas cepas dentro de clados con poca divergencia tenían perfiles de presencia de homólogos muy distintos respecto a cepas dentro del mismo clado. Para descartar la posibilidad de que se trataran de artefactos causado por el *dataset*, se evaluó la calidad de los genomas y se encontró una relación entre baja calidad del ensamblado y las cepas con perfiles distintos. Por lo que se estableció un corte por calidad para eliminar los artefactos del análisis. Al realizar el corte por calidad, las cepas dentro el clado en el que se apreciaba la expansión poblacional también quedaron fuera de la selección. No se realizó un análisis para determinar si la expansión poblacional de este clado también correspondía a un artefacto por la calidad de estos genomas. Únicamente se muestran los resultados de la reconstrucción filogenética de la base de datos genómica final.

El árbol que corresponde únicamente a la especie *Cmm* (Fig. 7A) muestra ramas cortas y nodos muy cercanos, lo cual es señal de la gran similitud y poca divergencia entre las cepas. La excepción a esto son dos cepas denominadas CASJ001 y CASJ007 (subclado XC), que muestran una alta divergencia si se comparan con el resto de las cepas de su misma especie. La mayor parte de los subclados de *Cmm* tiene pocos miembros o presentan politomías. En tres de los subclados, dos de los cuales se muestran en la Fig. 7B y uno en la Fig 7C, se observa una topología desequilibrada. Las cepas se encuentran colocadas en distintos subclados lo que indica que no son clonales y, como se verá más adelante, su posición se correlaciona con rasgos genómicos analizados.

8.2.2 Influencias del tiempo y el hospedero en *Cmm*: relaciones entre las características poblacionales de los hospederos de *Cmm* y la reconstrucción filogenómica

La información de las características poblacionales de los hospederos puede aportar información relevante acerca de la historia de las cepas estudiadas, como lo son su transmisión o evolución. Pero es importante tomar en consideración diversas perspectivas (*i. e.*, espacial, temporal, etc.) para poder observar si existe tal influencia sobre el agrupamiento de las cepas en un árbol (Grenfell et al., 2004). Dado que se dispone de información de los hospederos de la mayoría de las cepas de *Cmm* analizadas, se añadió la información referente al lugar y año de colecta del hospedero y la variedad de éste al árbol de *Cmm* (Fig. 8). En algunos de los clados (XA, XB, XC, XD, XF, XI) faltó información de los hospederos, por lo que el resto del análisis se limitó a los clados en los que se disponía de información suficiente. También se descartaron los clados donde no se aprecia correlación en ninguno de los datos de los hospederos (XJ) o con muy pocos miembros (XK).

No se observó una relación entre la ubicación de donde fueron colectados los hospederos. Esto significaría que no hay una correlación entre las cepas en cada clado de acuerdo con la localización geográfica de sus hospederos, aunque es interesante que cepas aisladas en México se colocaron junto a cepas aisladas fuera del país (XC). Tampoco se observó una correlación entre las cepas y la variedad del hospedero del que provienen, con excepción de los subclados XG y XH, en los cuales todas las cepas provienen de la misma variedad de hospedero. Mientras que en ciertos subclados como XE y XL, aunque se observó que las cepas provienen de múltiples variedades de hospederos, la mayor parte de ellas provienen de unas pocas variedades. Interesantemente, al observar los datos del año de colecta de los hospederos, es notable que los subclados XE, XG, XH y XL están dominados por cepas que fueron aisladas en los mismos años. De entre los tres datos analizados, este es fue el único común en todos los subclados examinados, aunque también se observa que cepas aisladas en los mismos años se colocaron en distintos subclados (por ejemplo: año 2015 provenientes de hospederos de la variedad Merlice en subclados XE y XG).

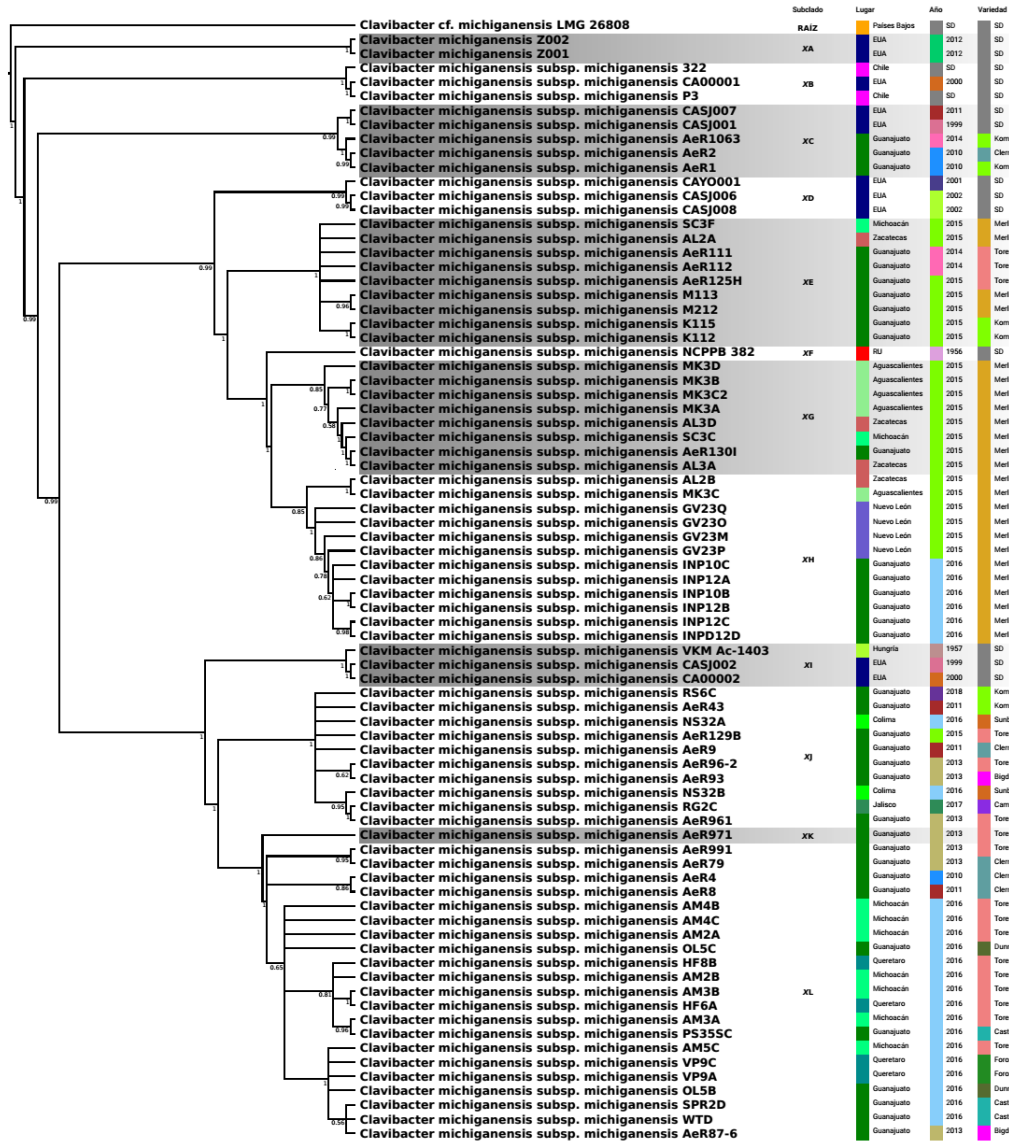


Figura 8 Asociación del árbol filogenético de *Cmm* con los datos de las características poblacionales de los hospederos. Las columnas a la derecha contienen los datos del lugar de colecta, el año de colecta y la variedad del hospedero (todas las cepas fueron aisladas de *S. lycopersicum*). Se asignó un color a cada variable en cada caso y se indica a qué corresponde. Se transformó la longitud de las ramas del árbol para observar con claridad la agrupación de las cepas en clados (subclados del clado X de *Cmm*), lo que permitió asignar una clave a cada uno de éstos (XA-XL). Se muestra el soporte de las ramas como probabilidad posterior.

8.3 Genómica comparativa

Estudios realizados desde diversas perspectivas concuerdan en la importancia de las proteasas y PCWDE en el proceso de infección y patogenicidad de *Cmm* (Chalupowicz et al., 2017; Flügel et al., 2012; Savidor et al., 2012). Desde la publicación del genoma de NCPPB 382, el primero de *Cmm* (Gartemann et al., 2008), mucho del conocimiento generado respecto a genes de virulencia y patogenicidad, se basó en la utilización del genoma de esta cepa como referencia. De igual forma, las poblaciones de *Cmm* alrededor del mundo han sido comparadas con esta cepa cuando se caracteriza la presencia de factores de patogenicidad en aquellas. Como resultado, se ha observado cierto grado de variabilidad en la presencia de estos elementos e, interesantemente, efectos variables sobre la capacidad patogénica de estas bacterias.

Por lo anterior, era importante saber qué implicaba la variabilidad encontrada en las cepas de *Cmm* para el contenido de PCWDE y proteasas de sus genomas, y compararlo con otras especies. Se realizó una búsqueda de todos los genes de PCWDE y proteasas en todos los genomas de las cepas en las filogenias de las figuras 6 y 7. A los análisis se añadieron genomas de bacterias de géneros taxonómicamente cercanos que han sido aisladas con cepas de *Cmm*, y otros genomas de bacterias de estos mismos géneros. Los microorganismos anteriores representan miembros de un mismo microbioma (Tabla suplementaria 3), lo que podría ser relevante para la naturaleza anfibionte de *Cmm*.

8.3.1 Diferencias de abundancia de proteasas y PCWDE en el género *Clavibacter*

La primera aproximación empleada fue analizar la abundancia de estas enzimas en los genomas de nuestra base de datos. Considerando los tamaños variables de los genomas bacterianos, se reportan los resultados de este análisis como abundancia relativa. Este valor se expresa como el porcentaje de genes encontrados de cada una de estas dos categorías de enzimas respecto al número total de genes de cada genoma (Fig. 9). En general, las cepas dentro del clado de *Cmm* (X) poseen una mayor abundancia relativa de PCWDE, especialmente los subclados XH y XL. Las cepas CASJ001 y CASJ007, dentro del subclado XC, poseen una menor abundancia de PCWDE que el resto de las cepas de *Cmm*. Estas dos cepas, en particular, poseen una cantidad considerablemente mayor de genes que el resto de las cepas, por lo que naturalmente la abundancia relativa de estas enzimas es mucho menor en sus genomas.

Al comparar la abundancia de las PCWDE en *Clavibacter* con otros géneros (Figura suplementaria 1) es notable que algunas cepas (clados V, VI, VII) tienen una abundancia similar o menor a la de otros géneros, tales como *Agreia* (M1), *Curtobacterium* (M2) y algunas cepas de *Microbacterium* (M3). En el caso de las proteasas, no se observa una agrupación tan definida de cepas con gran abundancia relativa en los mismos clados. (Fig. 9). Nuevamente, las cepas CASJ001 y CASJ007 poseen una menor abundancia relativa que el resto de sus congéneres. Sin embargo, esto se podría deber al mismo motivo: poseen una cantidad considerablemente mayor de genes que el resto de las cepas (Fig. 8).

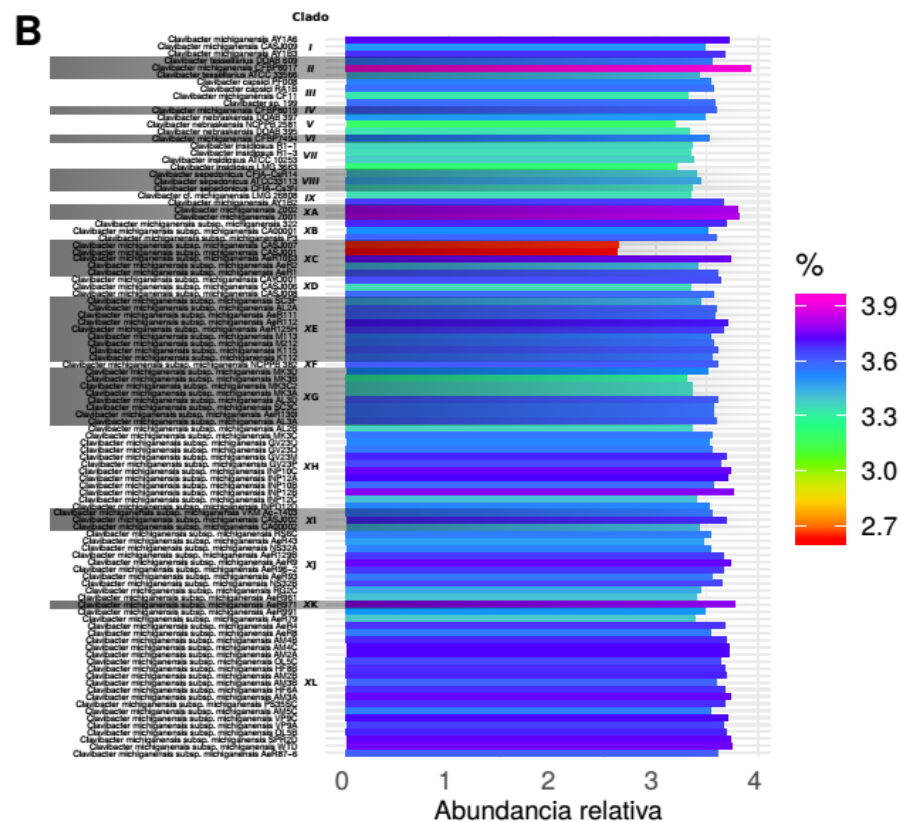
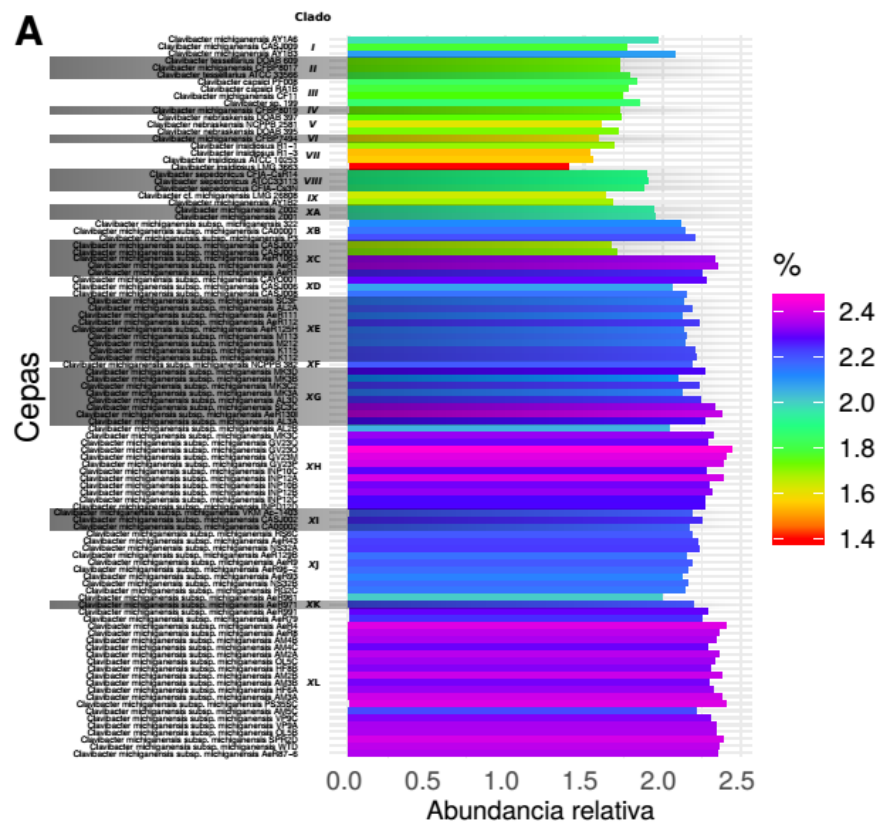


Figura 9. Abundancia relativa de PCWDE (A) y proteasas (B) en los genomas analizados del género *Clavibacter*. Las barras se encuentran ordenadas conforme a las filogenias de las figuras 6 y 7. A la derecha del nombre de cada cepa se indica el clado o subclado en el que se encuentran agrupadas.

8.3.2 Exploración de familias de proteasas y PCWDE: variación en los perfiles de presencia y ausencia en el género *Clavibacter*

Las especies del género *Clavibacter* comparten homólogos de PCWDE y proteasas entre ellas (Bentley et al., 2008; Tambong, 2017). Algunos de éstos, como en *Cmm*, también tienen roles en la capacidad patogénica de estas especies (Hwang et al., 2018). Con el fin de identificar diferencias entre familias de proteasas y PCWDE conservadas y específicas de cada especie, se clasificaron las secuencias de ambos tipos de enzimas en familias conforme a su homología. Estos análisis dieron lugar a *heatmaps* de ausencia o presencia de homólogos de proteasas (Fig. 10) y PCWDE (Fig. 11).

Las cepas dentro de cada clado, e incluso a nivel de subclado, mostraron perfiles similares de familias de proteasas o PCWDE presentes en sus genomas. Esto es más evidente en el caso de las PCWDE. Hay algunos subclados dentro de *Cmm* que tienen familias de enzimas que los distinguen entre sí, como es el caso de los subclados XG, XH, XK o XL. Curiosamente muchas de estas familias que distinguen subclados específicos de *Cmm* están presentes en otras especies de *Clavibacter*, e incluso en otros géneros.

Como siguiente paso, se localizaron las familias donde se encontraban los elementos funcionales conocidos ligados a la patogenicidad en *Cmm*. En el caso de las proteasas, se observa que hay homólogos de estas proteínas en prácticamente todos los clados de otras especies. Aunque se observa cierta variación en otros géneros bacterianos. Por ejemplo, homólogos de la proteína SrtA únicamente se encuentran ausentes del grupo de *Micrococcus*, mientras que no se encuentran homólogos de PpaG o PpaF fuera del género *Clavibacter*. Muchas de las cepas de *Cmm* poseen más de dos homólogos de la familia donde se encuentran SbtA, B y C.

Por otra parte, en las PCWDE, se observan más diferencias en los perfiles de presencia/ ausencia de estos elementos en otras especies de *Clavibacter*. En el caso de CelA prácticamente todas las cepas de *Cmm* poseen más de un homólogo, algo que comparten con sólo dos especies más, *C. nebraskensis* (clado V) y *C. insidiosus* (clado VII). Homólogos de endX/Y y XysB se encuentran prácticamente en todos los clados de *Clavibacter* salvo el clado VIII. La enzima PelA1 también se encuentra en genomas de los clados I y III (donde se encuentran las cepas de *C. capsici*). PelA2 se encuentra en genomas del clado I y curiosamente ausente del subclado XA de *Cmm*. TomA únicamente se encuentra en los subclados de *Cmm*, salvo el subclado XA. Algunos de los elementos ligados a la patogenicidad se encontraron presentes en fuera del género *Clavibacter*. Sin embargo, en la mayoría de los casos se observó que la presencia de homólogos de estos elementos es menos frecuente y no está necesariamente relacionada con el coaislamiento de estas cepas con una cepa de *Clavibacter*. Por ejemplo, dentro del grupo de M3 de *Microbacterium* se observó la presencia de homólogos de CelA en dos cepas (RA1A y RA1C) que fueron aisladas en el desarrollo de este trabajo junto con la cepa RA1B de *C. capsici*, pero también se observó la presencia de un homólogo de este elemento en la cepa Wellendorf que no fue aislada de un ser vivo (Tabla suplementaria 3). En otro caso como PelA1, se observó la presencia de un homólogo únicamente en la cepa FDAARGOS_333 del grupo de *Micrococcus* (M4) pero no en AeR127B, una cepa coaislada con *Cmm*, ni en el resto de las cepas en el grupo.

Familias

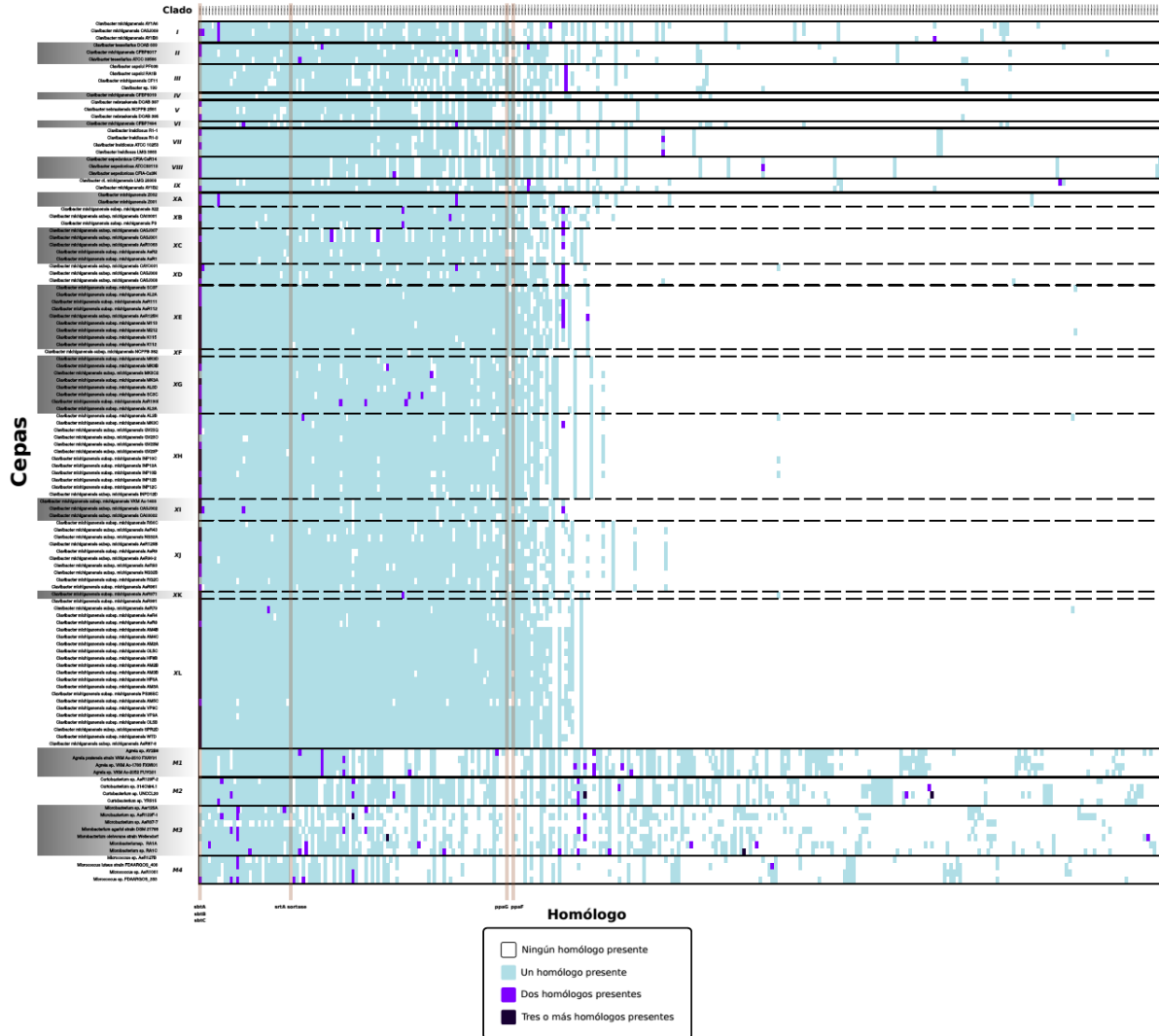


Figura 10. Heatmap de familias de genes de proteasas presentes en el género *Clavibacter* y organismos cercanos. Las columnas representan distintas familias de proteasas, y las filas las cepas analizadas. Las cepas fueron ordenadas de acuerdo con las filogenias de las figuras 6 y 7. El color de las casillas indica el número de homólogos de una familia de proteasas presente en un genoma. Las columnas sombreadas señalan la familia donde se encontraron factores de virulencia conocidos en *Cmm*. Las líneas continuas representan divisiones entre clados y las líneas punteadas divisiones entre subclados del clado X de *Cmm*.

Familias

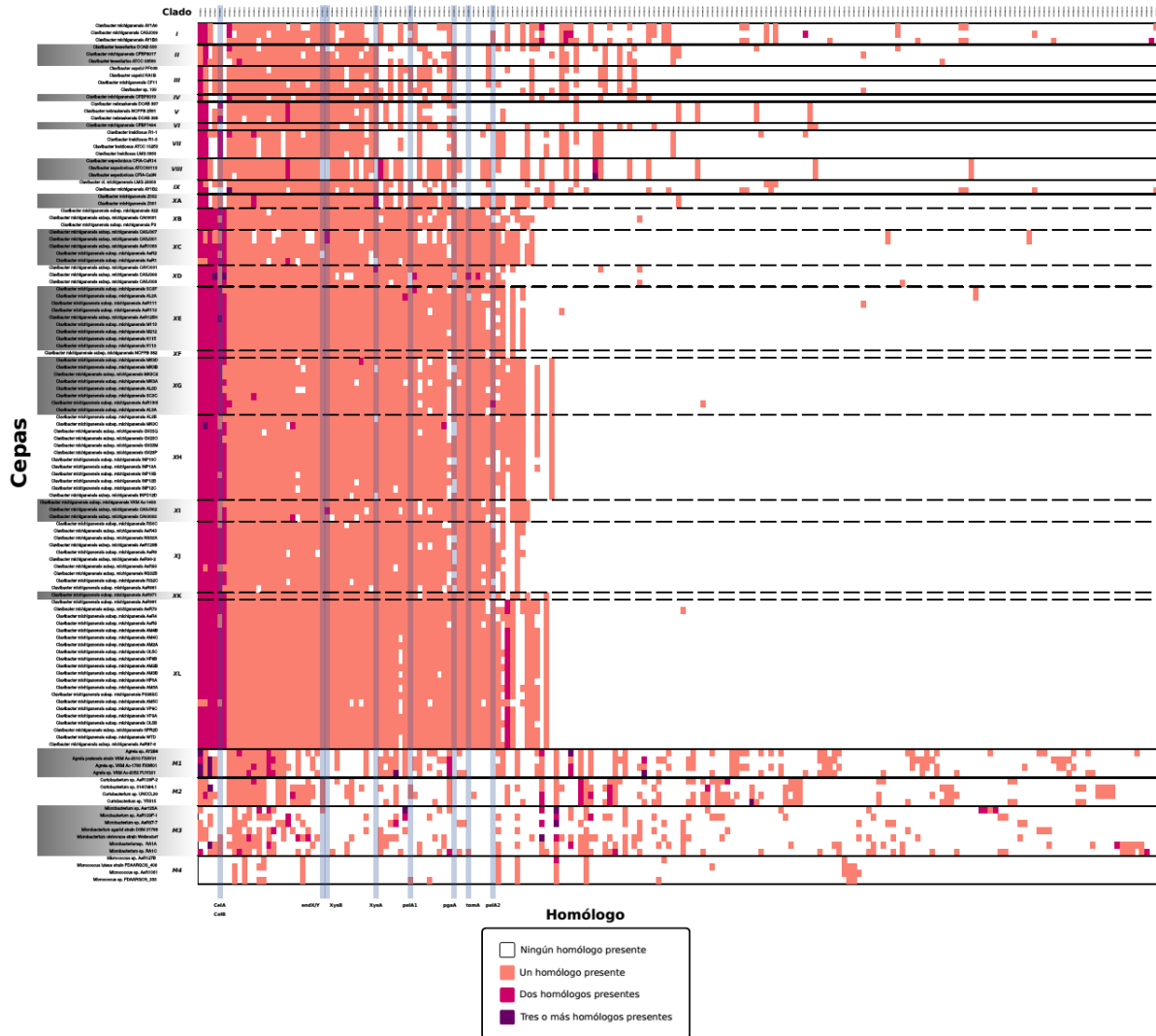


Figura 11. Heatmap de familias de genes de PCWDE presentes en el género *Clavibacter* y organismos cercanos. Las columnas representan familias de PCWDE distintas, y las filas las cepas analizadas. Las cepas fueron ordenadas de acuerdo con las filogenias de las figuras 6 y 7. El color de las casillas indica el número de homólogos de una familia de PCWDE presente en un genoma. Las columnas sombreadas señalan la familia donde se encontraron factores de virulencia conocidos en *Cmm*. Las líneas continuas representan divisiones entre clados y las líneas punteadas divisiones entre subclados del clado X de *Cmm*.

8.3.3 Secretoma variable: diferencias en el secretoma de las cepas de *Cmm* con respecto a la cepa de referencia NCPPB 382

Las proteínas secretadas por las bacterias cumplen roles relacionados con funciones importantes, como la adquisición de nutrientes, además de servir como intermediarias de la interacción entre la bacteria y su medio (Tseng et al., 2009). Muchas bacterias patógenas secretan factores de virulencia y toxinas para modificar las condiciones del medio circundante a unas que les sean más favorables (Maffei et al., 2017). Se piensa que los organismos que colonizan el xilema, como *Cmm*, secretan enzimas para degradar las paredes de este tejido y obtener nutrientes (Yadeta & Thomma, 2013) debido a que estos son escasos en la savia del xilema. En el caso de *Cmm*, la secreción de proteínas, en particular de proteasas y PCWDE, está ligada a la interacción con su hospedero (Hiery et al., 2015; Savidor et al., 2014). Por esta razón resultaba importante determinar cuáles de las familias de estas enzimas halladas en los genomas analizados podrían estar actuando en la interacción bacteria-hospedero.

Para este fin, se emplearon los programas SignalP y TatP para detectar la presencia de péptidos señal para las vías Sec y Tat, en las proteasas y PCWDE de los genomas analizados. La información obtenida se añadió a la agrupación o clasificación por homología de proteasas (Fig. 12) y PCWDE (Fig. 13). Estos análisis permitieron identificar una variación notable de la presencia de los péptidos señal dentro de una misma familia enzimática. Incluso dentro de un mismo clado se encontró que puede haber cepas que posean un miembro de la misma familia de homólogos sin que en éste se haya detectado un péptido señal en él. Este es el caso de varias de estas familias, de ambos tipos de enzimas, presentes en la cepa de referencia NCPPB 382. Otro hecho que resaltó fue la detección de péptidos señal en algunas de las familias distintivas de los subclados de *Cmm*, que no se encuentran presentes en la cepa de referencia. Las funciones predichas para estas familias de proteínas se incluyen en las Tabla 2 y 3.

Familias

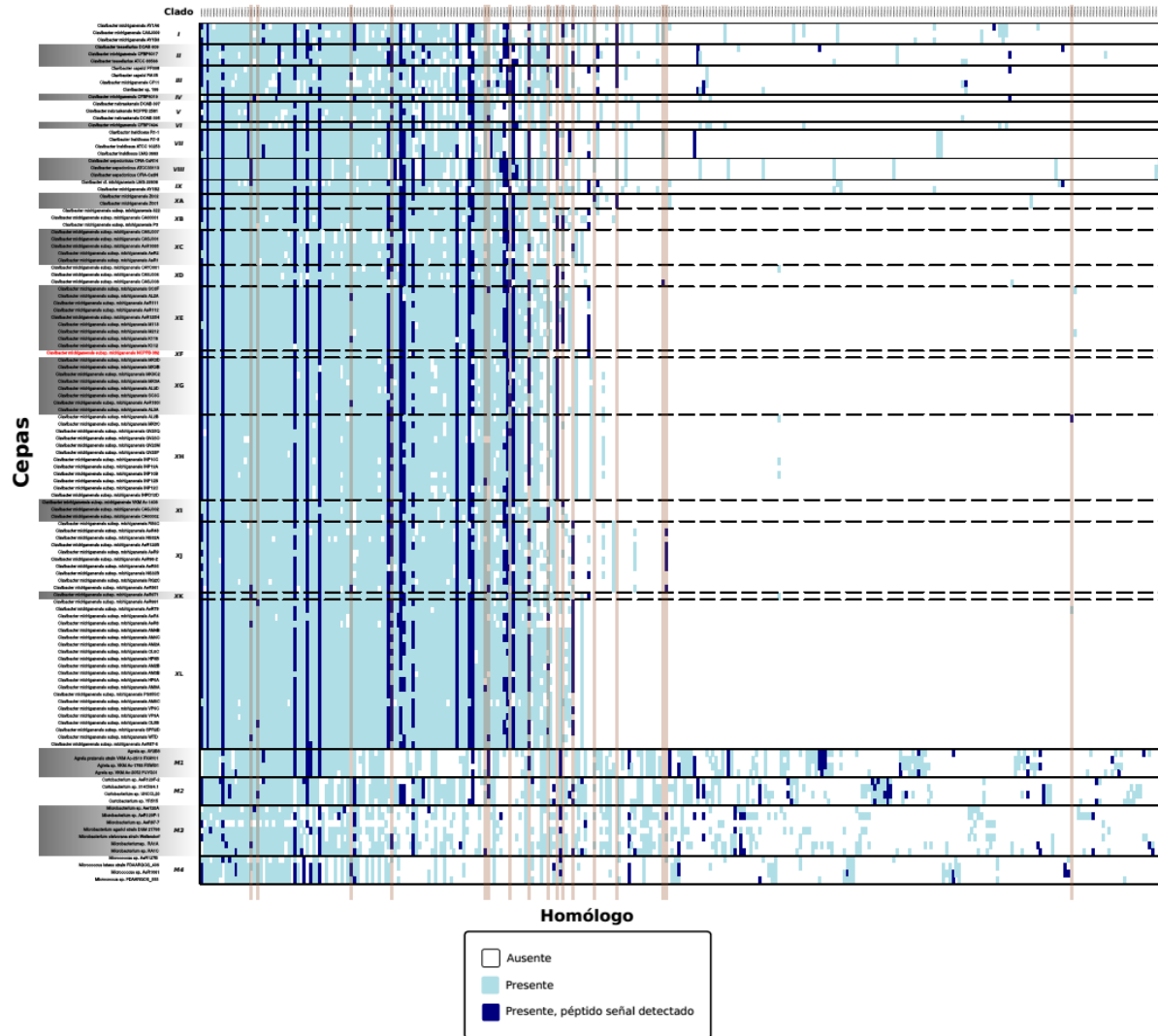


Figura 12. Heatmap de familias de genes de proteasas presentes en el género *Clavibacter* y algunos géneros cercanos en las que se detectaron péptidos señal. Las columnas representan familias de proteasas distintas, las filas las cepas analizadas. Las cepas fueron ordenadas de acuerdo con las filogenias de las figuras 6 y 7. El color de las casillas indica la presencia de homólogos de una familia de proteasa en un genoma (de acuerdo con la figura 10) y si se detectó un péptido señal de secreción en éstos. Las columnas sombreadas señalan las familias de proteasas donde se encontraron péptidos señal en cepas de *Cmm* distintas a NCPPB 382 (nombre de la cepa en rojo). Las líneas continuas representan divisiones entre clados y las líneas punteadas divisiones entre subclados del clado X de *Cmm*.

Familias

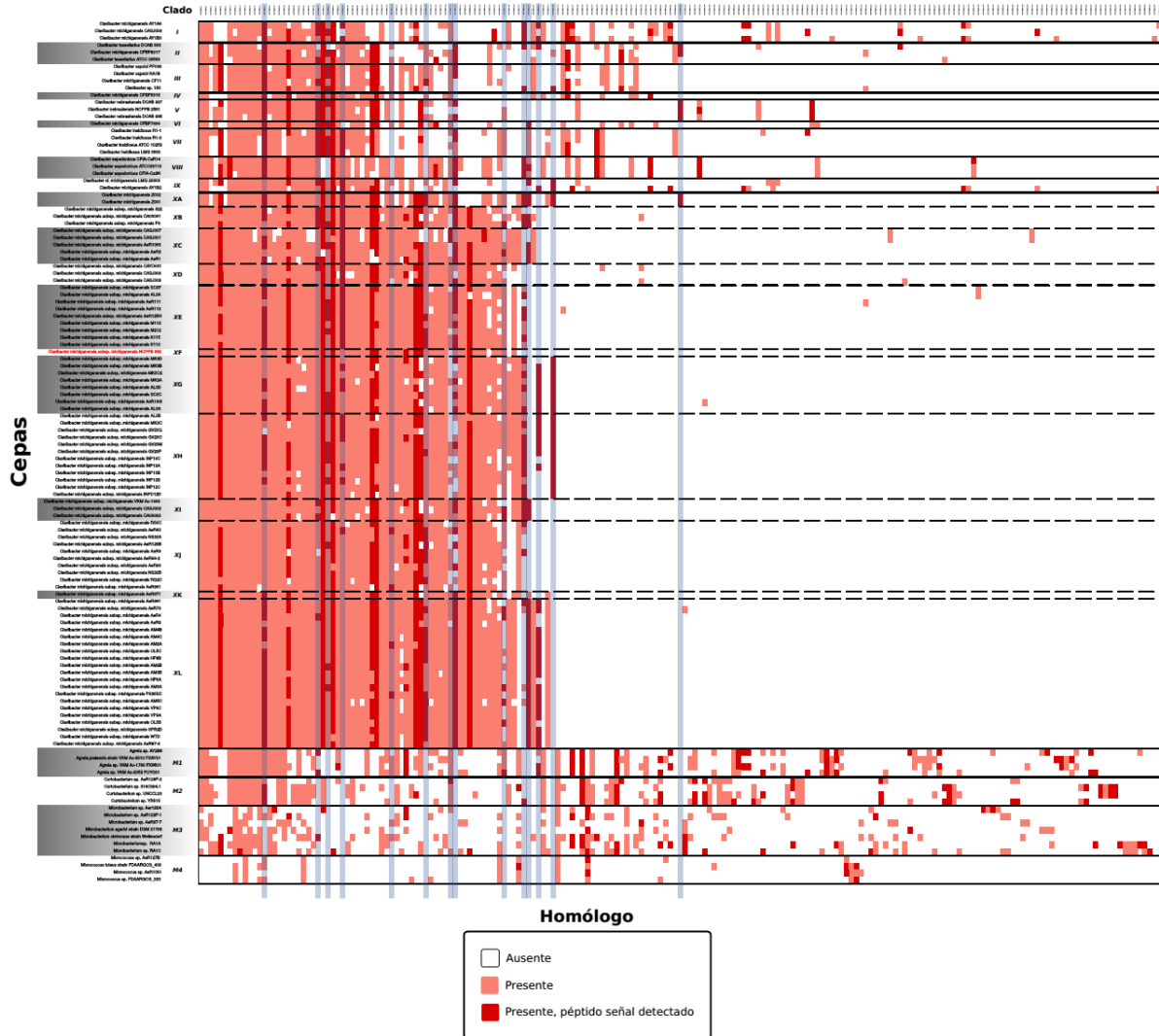


Figura 13. Heatmap de familias de genes de PCWDE presentes en el género *Clavibacter* y algunos géneros cercanos en las que se detectaron péptidos señal. Las columnas representan familias de PCWDE distintas, las filas las cepas analizadas. Las cepas fueron ordenadas de acuerdo con las filogenias de las figuras 6 y 7. El color de las casillas indica la presencia de homólogos de una familia de PCWDE en un genoma (de acuerdo con la figura 11) y si se detectó un péptido señal de secreción en éstos. Las columnas sombreadas señalan las familias de PCWDE donde se encontraron péptidos señal en cepas de *Cmm* distintas a NCPPB 382 (nombre de la cepa en rojo). Las líneas continuas representan divisiones entre clados y las líneas punteadas divisiones entre subclados del clado X de *Cmm*.

Tabla 2. Función predicha de familias de proteasas con péptido señal. En la columna de la derecha se indican los subclados donde se encuentran estas proteínas.

	Función predicha	Subclados de <i>Cmm</i>
1*	lisostafina	J, K, L
2*	proteína tipo represor LexA	L
3*	DegP peptidasa	E, G, J
4*	lisostafina	B, C, D, G, H, I, J, L
5*	peptidasa de señal	H, L
6*	sedolisin	E, J, L
7*	peptidasa de señal	D, G, H
8*	endopeptidasa	C, D, E, G, H, J, L
9*	endopeptidasa	I, L
10**	lipasa	B, D, E, G, H
11**	endopeptidasa	B, D, E, I
12**	sortasa A	C, J, L
13**	peptidasa de señal	A
14**	lipasa	A
15**	lisil endopeptidasa	D
16**	lisostafina	K
17**	D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa A	H

*Presente en NCPPB 382, pero sin péptido señal.

**No presente en NCPPB 382.

Tabla 3. Función predicha de familias de PCWDE con péptido señal. En la columna de la derecha se indican los subclados donde se encuentran estas proteínas.

	Función predicha	Subclados de <i>Cmm</i>
1*	acetil-xilan-esterasa	A, B, C, D, E, G, H, K, L
2*	acetil-xilan-esterasa / endo- β -1,6-galactanasa	B, C, D, I, L
3*	xilanasa	B, C, E, G, H, J, L
4*	arilesterasa	A, B, C, D, E, G, H, J
5*	β -fructofuranosidasa	J, L
6*	acetil-xilan-esterasa	A, E, H, J, L
7**	α -galactosidasa	C
8*	poligalacturonasa	A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L
9*	acetil-xilan-esterasa	B, C, I, L
10**	β -mananasa / β -1,3-xilanasa	A, B, E, G, H, I, J, L
11**	acetil-xilan-esterasa	A, B, C, I, L*
12**	β -xilosidasa	G, H, L*
13**	β -glucosidasa / β -xilosidasa	A, G, H*
14**	pectato liasa	A*

*Presente en NCPPB 382 pero sin péptido señal.

**No presente en NCPPB 382.

9. DISCUSIÓN

9.1 ¿No hay especies del género *Clavibacter* en hospederos silvestres?

Dado que *S. lycopersicum* es el hospedero de *Clavibacter*, la colecta de variedades en estado silvestre prometía la posibilidad del aislamiento de cepas de ambientes distintos al invernadero. Sin embargo, únicamente se logró aislar una cepa de *Clavibacter* de las plantas muestreadas ¿Por qué motivo no se aislaron más bacterias de *Clavibacter*? Una posibilidad es que las bacterias del género son raras o poco abundantes en la naturaleza, lo cual significaría que habría que hacer un esfuerzo de muestreo o aislamiento aún mayor para poder obtener más de estas bacterias. Acorde con esta idea, está el trabajo desarrollado por Zinniel et al. (2002), en el cual aislaron múltiples cepas bacterianas asociadas a plantas de cultivos agronómicos y de praderas vírgenes. Aunque lograron identificar varias cepas de *Clavibacter*, esto partió de un trabajo de aislamiento de más de 800 cepas aisladas de 434 plantas colectadas a lo largo de 6 años.

Algo interesante de la cepa RA1B es que se trata de una bacteria de la especie *C. capsici* y no *Cmm*. Hasta donde tenemos conocimiento, la enfermedad causada por *C. capsici* en pimiento (*Capsicum annuum*) y chile tabasco (*Capsicum frutescens*) no tiene una distribución tan amplia como su contraparte en tomate. Tampoco tenemos conocimiento de reportes de esta bacteria en México, por lo que podría tratarse del primer reporte de *C. capsici* en el país. Esta observación, así como la posible baja ocurrencia de *Cmm* en tomates silvestres, sugiere que los procesos de mejoramiento genético de tomate, los cuales han sido intensivos reduciendo la diversidad genética de las plantas y la diversidad taxonómica del microbioma (Gopal & Gupta, 2016; Pérez-Jaramillo et al., 2016), podrían estar enriqueciendo a *Cmm* en sistemas agroecológicos altamente tecnificados. Esta posibilidad es discutida en la siguiente sección.

9.2 Inferencias desde la filogenia

La especificidad de hospedero se define como la capacidad de una especie patógena para colonizar (infectar) uno o varios hospederos (Pan et al., 2014). De acuerdo con la gama de hospederos que un organismo sea capaz de colonizar se determina si tiene una baja o alta especificidad (pocos vs. muchos hospederos). Es notable que varias de las cepas de *Clavibacter* que se agrupan dentro de los mismos clados provengan de plantas que no están estrechamente relacionadas (monocotiledóneas vs. dicotiledóneas). También es notable que en una misma especie (*S. lycopersicum*) se hayan encontrado cepas de distintos linajes de este género bacteriano. Esto podría indicar que las bacterias del género *Clavibacter* podrían ser capaces de colonizar una variedad de hospederos independientemente de su cercanía taxonómica. Es decir, tienen una baja especificidad de hospedero. Sin embargo, esta característica parece desacoplada de la capacidad de producir enfermedad en algunos hospederos. Thapa y colaboradores (2017) observaron que cepas como CFBP8017 que no causan síntomas de enfermedad en *S. lycopersicum* se agrupan con otras especies que pueden ser patógenas en otras especies de plantas y que éstas, además, son capaces de causar enfermedad en las mismas especies. Esto podría ser un indicio de que la capacidad de causar enfermedad en ciertos hospederos podría ser un rasgo ligado al linaje al que pertenece una cepa, es decir, de un cierto grado de especialización a un hospedero.

RA1B fue aislada de una planta de *S. lycopersicum* sin síntomas de enfermedad. Sin embargo, no se evaluó su capacidad de causar enfermedad en ésta u otras especies de hospederos. Por otra parte, los análisis por ANI que indican que pertenece a la especie *C. capsici*, capaz de producir síntomas de enfermedad en *C. annuum*, y su agrupación en el mismo clado con la cepa PF008 de la misma especie, sugieren que podría tener las mismas capacidades patogénicas que esta última cepa. Como se discutirá más adelante, los análisis posteriores revelaron que, en efecto, las cepas dentro de los mismos clados poseen características genómicas similares que podrían estar ligadas a la capacidad patogénica de las especies de *Clavibacter*.

En la reconstrucción filogenómica de las cepas de *Cmm* se observan varios subclados con pocos miembros, o con politomías, por lo que es complicado hacer inferencias acerca de la historia de las cepas dentro de estos subclados basados en su topología. Aunque, por otro lado, se observa una topología desequilibrada en la distribución de las cepas en algunos clados. Esta distribución ha sido relacionada en otros patógenos con un reflejo de presión de selección sobre el patógeno como, por ejemplo, el sistema inmune del hospedero (Grenfell et al., 2004). Sería muy osado sugerir, basados únicamente en la topología de la filogenia, que un fenómeno relacionado con presión de selección sobre *Cmm* se encuentre sucediendo en el caso de esta bacteria. Usualmente, este tipo de análisis producen mejores resultados a partir de la recolección de datos a gran escala, resultado de la colecta masiva de muestras en una amplia distribución geográfica y por tiempos de muestreo prolongados (Pybus & Rambaut, 2009). Algo que no se cumplió en nuestro caso dado que, como se discute más adelante, los subclados con esta topología agrupan cepas aisladas durante los mismos años. Esto no significa que la estructura del árbol carezca de valor, aún fue posible emplear la filogenia en combinación con otros datos para poder hacer otro tipo de inferencias a partir de ésta.

Utilizando el marco filogenético como guía, a distintos niveles de resolución, fue posible analizar la información de los hospederos de las cepas de *Cmm*, aportando resultados interesantes. Por ejemplo, parecería que en algunos subclados la agrupación de las cepas está relacionada con la variedad de *S. lycopersicum*. Considerando las vías de transmisión de *Cmm*, esto sugiere que hay una fuerte influencia de la transmisión vertical, ya que los mismos linajes bacterianos se encuentran en las mismas variedades de hospederos. Sin embargo, la coincidencia con los años de aislamiento sugiere que la mayor influencia entre los linajes es la temporal. En este sentido, se tiene que tomar en cuenta que los hospederos de las cepas de *Cmm* provienen de invernaderos de alta tecnología, en dónde comúnmente hay instancias encargadas únicamente de la producción de semillas o plántulas, muchas de las cuales luego son trasladadas a invernaderos donde se completa la producción de la hortaliza.

Considerando lo anterior, existe la posibilidad de que los procesos de generación de semillas y plántulas asociados a la producción agrícola intensiva tengan una influencia en la genealogía de las cepas. Esto es, variedades de tomate (¿y quizás otras hortalizas?) infectadas con *Cmm* transmiten su cepario de *Cmm* a la siguiente generación. Así mismo, si en algún punto ocurre, algunas variedades que comparten el mismo espacio se podrían infectar con la misma cepa, las cuales parecen ser distintivas de ciertas variedades para algunos casos. El traslado de las plantas entre distintos sitios de producción de semillas, plántulas y producción de fruto, podría explicar porqué no se ve una correlación con la

ubicación geográfica del hospedero. Mientras que el agrupamiento en distintos subclados de cepas aisladas en los mismos años de las mismas variedades sugiere múltiples orígenes de las fuentes de infección.

9.3 El papel de la abundancia de proteasas y PCWDE

Los análisis de abundancia mostraron que las cepas de *Cmm* poseen, proporcionalmente, una cantidad mayor de PCWDE en sus genomas que otras cepas de otras especies de su mismo género o géneros cercanos. Estos resultados concuerdan con aquellos obtenidos por Thapa y colaboradores (2017) para las PCWDE, aunque en su caso la abundancia de estas enzimas fue reportada como abundancia absoluta, lo que hace difícil la comparación directa con nuestros datos.

Análisis genómicos de PCWDE en otros organismos fitopatógenos sugieren que aquellos que tienen un estilo de vida patogénico tienden a poseer un contenido mayor de PCWDE (Zhao et al., 2014). Varias de las cepas de especies patógenas, tales como *C. tessellarius* (clado *II*), *C. nebraskensis* (clado *VI*), *C. insidiosus* (clado *VII*), tienen una abundancia similar a la encontrada en cepas no patógenas, como CASJ009 (clado *I*), LMG 26808 (clado *IX*), o incluso géneros en los que no se conocen a la fecha especies patógenas como *Agreia* (M1). Esto podría ser un indicio de que en el caso de *Clavibacter* la abundancia de PCWDE y la patogenicidad en cada especie no están necesariamente correlacionados. Es decir, que el papel de estas enzimas, mismas que claramente han sido enriquecidas durante la historia evolutiva de estos microorganismos, podría ser funcionalmente otro, en sintonía con la naturaleza anfibionte de estos microorganismos.

Pero, ¿qué significado podría tener que en especies como *Cmm*, donde aparentemente la relación entre la abundancia y el estilo de vida como patógeno se cumple, haya linajes con una mayor cantidad de estas enzimas? Una mayor cantidad de estas enzimas podría ser un indicio de que estos linajes en particular disponen de más mecanismos para degradar las paredes celulares de sus hospederos. En consecuencia, para estos casos, sí se podría estar cumpliendo con la expectativa de estar ligada la abundancia a la virulencia, lo que sólo se podría confirmar mediante experimentos adicionales.

9.4 Perfiles distintivos de proteasas y PCWDE: ¿se relacionan con los hospederos?

Por otra parte, la presencia y la diversidad de ciertas familias de genes en un organismo puede relacionarse con su estilo de vida y su especificidad por un hospedero (Hardoim & Hardoim, 2017; Baroncelli et al., 2016; Karpinets et al., 2014). Los *heatmaps* de las familias conservadas de proteasas y PCWDE revelaron diferencias interesantes. Dado que es más común hallar homólogos de proteasas relacionados a la patogenicidad de *Cmm* en otras especies, que del tipo PCWDE, podría ser que éstas últimas son un rasgo distintivo relacionado con la capacidad patogénica en los distintos hospederos. A través de pruebas con PCWDE en otros organismos fitopatógenos de monocotiledóneas y dicotiledóneas se ha observado que estas enzimas tienen una preferencia por sustratos más similares a la pared celular de sus respectivos hospederos, específicamente, una mayor actividad hidrolítica (King et al., 2011) algo que puede reflejarse en la presencia de ciertas familias enzimáticas en un genoma (Baroncelli et al., 2016; Ohm et al., 2012). Esta observación sugiere la adopción de mecanismos mejor adaptados para degradar las paredes celulares de sus hospederos, con

un grado de especificidad detectable, lo que podría ser el caso para especies del género *Clavibacter*.

Se han aislado cepas de *Clavibacter* de distintos linajes a partir de tejidos de *S. lycopersicum*, varias de las cuales no producen enfermedad en esta planta (Osdaghi et al., 2018; Thapa et al., 2017; Yasuhara-Bell & Alvarez, 2014; Zaluga et al., 2013), algunas de las cuales fueron incluidas en este trabajo. La diversidad y las diferencias en la presencia o ausencia de ciertas familias enzimáticas, especialmente aquellas en donde se encuentran los genes que han sido ligados al desarrollo de la enfermedad, podrían explicar la incapacidad de algunas cepas de causar enfermedad en algunos hospederos. Esta observación apoya la idea de que existe la adaptación de mecanismos específicos para la degradación de las paredes celulares de cada especie a su hospedero.

9.5 Secretomas distintos: más allá de la presencia o ausencia de genes

Es notable que en varias cepas de *Cmm* se hayan encontrado enzimas que en la cepa NCPP382 carecen de péptido señal. Por el lado de las proteasas, fue posible predecir algunas funciones interesantes: peptidasas de péptido señal, sortasas y lipasas. Las peptidasas de péptido señal son enzimas importantes para la maduración de precursores de proteínas secretadas por las vías Sec y Tat (Paetzel et al., 2002). Se encargan de cortar el péptido señal de los precursores. Las sortasas están implicadas en la adhesión de proteínas a la pared celular bacteriana, muchas de las cuales son factores de virulencia (Spirig, Weiner, & Clubb, 2011). Las lipasas han adquirido cierta importancia como factores de virulencia en los últimos años (Subramoni et al., 2010). Se sabe que pueden influir en los procesos de colonización, ya que pueden ayudar a sortear las barreras, como la cutícula de las plantas compuestas por polímeros cerosos. Si bien degradan lípidos y no proteínas, la estructura en su sitio funcional es similar al de las serin-proteasas (Gupta et al., 2004), por lo que esa podría ser la razón por la que se detectaron en este análisis.

Por parte de las PCWDE, parece que la mayoría de las enzimas son proteínas con capacidad de degradar hemicelulosa, una de las moléculas que dan resistencia a la pared celular al interactuar con las fibras de celulosa (Cosgrove, 2016), por lo que podrían tener relevancia para la virulencia de estas cepas. Una diferencia interesante entre las cepas selectas es que prácticamente en ninguna familia enzimática se hallaron péptidos señal en todos los homólogos hallados en ellas. Si el secretoma de un organismo puede determinar la forma en las que se relaciona y comunica con otro ¿qué podrían significar estas diferencias para *Cmm*? La caracterización reciente de dos celulasas de *Cmm*, la destacada CelA y su homóloga CelB, demostró que la presencia del péptido señal es indispensable para que estas enzimas produzcan síntomas de enfermedad *in planta* (Hwang et al., 2018). De ser el mismo caso para que otros elementos del tipo proteasa o PCWDE lleven al desarrollo del cancro bacteriano y la aparición de síntomas, esto implicaría que la patogenicidad y la virulencia de las cepas no solamente está en función de la ausencia o presencia de elementos de patogenicidad en los genomas, sino también en la capacidad de éstos de ser secretados.

Los cambios pronunciados en la presencia del péptido señal en ortólogos dentro de un mismo género se han asociado a cambios en estilo de vida en otras bacterias (Hönigschmid et al., 2018). Aparentemente, este cambio está asociado a la evolución de un estilo de vida libre a un estado endosimbótico. No hay evidencia de que las bacterias del género *Clavibacter* estén

cambiando a un estado endosimbiótico. Sin embargo, la pérdida de los péptidos señal bien podría indicar, también, un cambio en la asociación que tienen estas bacterias con sus hospederos, así como en la interacción que pueden establecer con los mismos. Partiendo de esta hipótesis, resta la pregunta sobre qué fuerza es la que podría estar influyendo en la pérdida de péptidos señal en *Cmm*.

9.6 Consideraciones finales sobre la naturaleza anfibionte de *Clavibacter*

Cmm es una bacteria que coloniza un ambiente pobre en nutrientes. Las diferencias observadas entre las cepas, tanto en las familias de enzimas presentes como aquellas que se pueden secretar, son un indicio de que algunas de las cepas de *Cmm* podrían tener capacidades distintas de acceder a nutrientes en este ambiente en comparación con otras cepas de su misma especie. La diversidad de estas enzimas, explorada a profundidad en las poblaciones de *Cmm* por primera vez, también podría explicar porqué la variabilidad en la presencia de los factores de patogenicidad puede tener efectos dependientes de la cepa: mientras algunas cepas sí emplean principalmente los elementos ligados a la patogenicidad ya conocidos, otras podrían apoyarse además en mecanismos alternativos a éstos. Así mismo, podría ser que estos factores de patogenicidad tengan otros papeles aún por ser descubiertos, justamente relacionados a la naturaleza anfibionte de especies del género *Clavibacter*.

En otros organismos fitopatógenos, el control de la expresión de PCWDE está regulado por el *quorum sensing* y la disponibilidad de ciertos nutrientes en el ambiente, tales como la fuente de carbono (Bowden et al., 2013; Olsson et al., 2003). En el caso de los patógenos vasculares, como se ha clasificado a *Cmm*, una de sus fuentes de nutrientes es la pared celular de las plantas (Yadeta & Thomma, 2013), la cual no solamente varía en composición dependiendo de la especie y tipo celular (Popper, 2008), sino también por etapa de desarrollo de la planta (Lampugnani et al., 2018) o por condiciones de estrés (Houston et al., 2016).

En el contexto del cancro bacteriano en *S. lycopersicum*, la expresión de las PCWDE encontradas en *Cmm* también podría estar regulada de acuerdo con la disponibilidad de fuentes de carbono asociado a los cambios en la composición de la pared celular del hospedero, los cuales pueden ser consecuencia del avance de la enfermedad (Chalupowicz et al., 2017; Flügel et al., 2012; Savidor et al., 2012), del desarrollo de la planta, lo que explicaría las diferencias en la mortandad por cancro bacteriano en distintas etapas fenológicas (Sharabani et al., 2013), o del estrés provocado por las condiciones de cultivo en ambientes agroecológicos. La producción de tomate en ambientes agrícolas como los invernaderos de alta tecnología conlleva una alta dificultad, dado que implica el control cuidadoso de fuentes de estrés para las plantas como elementos bióticos y abióticos o el empleo de algunas prácticas agronómicas (Peet & Welles, 2005), aunque en ocasiones se provoca deliberadamente estrés sobre éstas para producir efectos que facilitan su propagación (Alberta Ministry of Agriculture and Forestry, 2004) o para obtener características organolépticas deseadas en los frutos (Zushi, 2008).

La respuesta de las cepas de *Cmm* a las situaciones anteriormente mencionadas, aunque fundamentalmente similar entre todas, podría tener consecuencias completamente distintas para sus hospederos. Lo anterior, considerando la variabilidad genómica encontrada tanto en la presencia o ausencia de familias enzimáticas PCWDE y proteasas como en la presencia

de péptidos señal. Lo cual es una imagen que enmarca muy bien la naturaleza multifactorial de la anfibiosis.

10. CONCLUSIONES

Clavibacter no es un género abundante en plantas de *S. lycopersicum* fuera de ambientes agroecológicos en los cuales, una combinación entre los sistemas de producción de estos sistemas y la naturaleza de la transmisión de estos organismos podrían estar enriqueciendo las microbiotas de las plantas con bacterias del género.

Las cepas de *Cmm* muestran poca divergencia en general. Sin embargo, claramente hay linajes distintos con caracteres genómicos propios de cada uno, cuya formación parece estar influenciada por dinámicas asociadas a los organismos hospederos.

La variedad en familias de proteasas y PCWDE más que la abundancia de éstas en una especie de *Clavibacter*, parece ser determinante en la capacidad que tienen estas bacterias de causar enfermedad en sus respectivos hospederos. Lo que apunta a la importancia del hospedero en la evolución genómica de *Clavibacter* respecto a estas enzimas.

Dada la importancia del péptido señal en los elementos funcionales ligados a la patogenicidad del tipo PCWDE y proteasa, las diferencias en la presencia de esta secuencia dentro de las mismas familias enzimáticas indican que las cepas de *Cmm* tienen distintas capacidades de interactuar con sus hospederos a través de sus secretomas. Lo que podría repercutir en el resultado de la interacción (espectro mutualista-patógeno) entre microorganismo y hospedero y explicar en parte la naturaleza anfibia observada en esta bacteria.

11. PERSPECTIVAS

Por cuestiones de tiempo el tercer objetivo específico de esta tesis no se pudo llevar a cabo, por lo que algunas de estas perspectivas, en particular las derivadas de los análisis de genómica comparativa, corresponden a los experimentos que pudieron ser planteados como parte de dicho objetivo:

1. Los análisis filógenómicos mostraron indicios de ciertas relaciones con la transmisión de *Cmm* y su posición en la filogenia. Por lo que sería importante un estudio completo para analizar las dinámicas de transmisión de *Cmm* que puedan alimentar otros estudios desde una perspectiva evolutiva y responder preguntas como: cuál es el origen de *Cmm* o sobre cómo evoluciona la patogenicidad en esta bacteria. Aunque nuestro laboratorio ha monitoreado brotes de cancro bacteriano por varios años y en varios sitios, este tipo de análisis se vería beneficiado de un aumento en el alcance tanto temporal como espacial de los datos disponibles. Por ejemplo, mediante la colaboración e intercambio de datos con otros grupos de trabajo dedicados al estudio de esta bacteria dentro o fuera del país o incrementando los esfuerzos de muestreo para el aislamiento de nuevas cepas de *Cmm*.

2. Aunque deben existir otros factores, además de proteínas como las PCWDE en la especificidad por un hospedero, tanto la gama como abundancia de estas enzimas en el genoma de un organismo con seguridad deben influir en su capacidad de ser patógeno en ciertas especies. La exploración de la relación en la presencia o ausencia de familias enzimáticas de PCWDE (o proteasas) en las especies de *Clavibacter* y su capacidad de desarrollar síntomas de enfermedad en algunos hospederos puede ser realizada, por ejemplo, evaluando la capacidad de degradar distintos sustratos encontrados en las paredes celulares de plantas y observar si hay correlaciones entre la actividad observada y perfiles como los encontrados en este trabajo.

3. La existencia de subclados con una mayor abundancia de PCWDE que además poseen familias de estas enzimas no encontradas en otros subclados podría estar relacionada con la virulencia en estas cepas. Por lo que algunas preguntas interesantes que derivan de esta observación son si estas enzimas confieren una mayor virulencia a estas cepas y cómo podrían influir en el desarrollo del cancro bacteriano. Un experimento simple para poder evaluar esto es la inoculación de plantas con cepas de *Cmm* de distintos perfiles de familias enzimáticas y observar si se presentan síntomas y en qué magnitud. Desde otro ángulo se podría evaluar si la inserción de los genes de estas enzimas en otras cepas o la remoción de éstos tiene un impacto en la virulencia.

4. La importancia de las diferencias en la presencia de péptidos señal dentro de las mismas familias enzimáticas y su influencia en la capacidad patogénica de las cepas de *Cmm* son dos preguntas muy interesantes. La caracterización funcional de familias enzimáticas selectas donde se aprecian diferencias en la presencia del péptido señal permitiría comenzar a responder esa pregunta. Por ejemplo, se podrían realizar mutaciones puntuales que cambien el marco de lectura para eliminar el péptido señal de estas enzimas y posteriormente evaluar el impacto de estas mutaciones sobre el desarrollo de síntomas *in planta*. Los análisis de dinámicas poblacionales en *Cmm* podrían ayudar a responder el porqué de la variación en la presencia de la secuencia del péptido señal.

5. A partir de las consideraciones finales mencionadas en la subsección 9.6 otra evaluación que podría realizarse sobre las cepas sería la respuesta de éstas a cambios en las fuentes de carbono. Por ejemplo, comparando la respuesta en la expresión de genes de PCWDE en cepas selectas con perfiles distintos expuestas a diferentes fuentes de carbono de origen vegetal.

12. DATOS SUPLEMENTARIOS

Tabla suplementaria 1. Lista de las muestras de plantas colectadas en estado silvestre.

No.	Muestra	Especie	Coordenadas		Estado	Sitio	Tejido colectado
			X	Y			
1	PB1	<i>Solanum lycopersicum</i>	21.042658	-101.25891	Guanajuato	Guanajuato	Fruto, tallo, hoja
2	CF1	<i>Solanum lycopersicum</i>	20.712714	-100.75785	Guanajuato	Comonfort	Fruto, tallo, hoja
3	RA1	<i>Solanum lycopersicum</i>	20.712714	-100.75785	Guanajuato	Comonfort	Fruto, tallo, hoja
4	RA2	<i>Physalis philadelphica</i>	20.712714	-100.75785	Guanajuato	Comonfort	Tallo, hoja
5	INI01	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.52086	-104.53456	Jalisco	La Huerta	Tallo, hoja
6	AUT01	<i>Solanum lycopersicum</i>	19.80285	-104.37653	Jalisco	Autlán	Fruto, tallo, hoja
7	AUT02	<i>Physalis</i> sp.	19.80403	-104.36251	Jalisco	Autlán	Fruto, tallo, hoja
8	AUT03	<i>Physalis philadelphica</i>	19.80285	-104.37653	Jalisco	Autlán	Fruto, tallo, hoja
9	CZP01	<i>Physalis</i> sp.	20.96488	-100.83816	Guanajuato	Cruz del Palmar	Fruto, tallo, hoja
10	CZP02	<i>Physalis</i> sp.	20.96488	-100.83816	Guanajuato	Cruz del Palmar	Fruto, tallo, hoja
11	PB2	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-	Guanajuato	Guanajuato	Tallo, hoja
12	ACJ01	<i>Solanum lycopersicum</i>	20.719671	-101.33245	Guanajuato	Irapuato	Fruto, tallo, hoja
13	RA03	<i>Solanum lycopersicum</i>	20.712714	-100.75785	Guanajuato	Comonfort	Fruto, tallo, hoja
14	AY01	<i>Solanum lycopersicum</i>	20.695807	-101.36047	Guanajuato	Irapuato	Fruto, tallo, hoja
15	AY02	<i>Solanum lycopersicum</i>	20.695807	-101.36047	Guanajuato	Irapuato	Fruto, tallo, hoja
16	AY03	<i>Solanum lycopersicum</i>	20.695807	-101.36047	Guanajuato	Irapuato	Fruto, tallo, hoja
17	INI02	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.5214	-104.53553	Jalisco	La Huerta	Fruto, tallo, hoja
18	INI03	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.5214	-104.53553	Jalisco	La Huerta	Fruto, tallo, hoja
19	INI04	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.5214	-104.53553	Jalisco	La Huerta	Fruto, tallo, hoja
20	CNCH01.1	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.49062	-104.56561	Jalisco	La Concha	Fruto, tallo, hoja
21	CNCH01.2	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.49062	-104.56561	Jalisco	La Concha	Fruto, tallo, hoja
22	CNCH01.3	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.49062	-104.56561	Jalisco	La Concha	Fruto, tallo, hoja
23	CNCH01.4	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.49062	-104.56561	Jalisco	La Concha	Fruto, tallo, hoja
24	AGC01	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.51084	-104.56929	Jalisco	Aguacaliente	Fruto, tallo, hoja
25	AGC02	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.51084	-104.56929	Jalisco	Aguacaliente	Fruto, tallo, hoja
26	AGC03	<i>Solanum nigrum</i>	19.51084	-104.56929	Jalisco	Aguacaliente	Fruto, tallo, hoja
27	AGC04	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.51084	-104.56929	Jalisco	Aguacaliente	Fruto, tallo, hoja
28	CRCV01	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.83623	-104.30056	Jalisco	El Corcovado	Fruto, tallo, hoja
29	CRCV02	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.83623	-104.30056	Jalisco	El Corcovado	Fruto, tallo, hoja
30	CRCV03	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.83623	-104.30056	Jalisco	El Corcovado	Fruto, tallo, hoja
31	CRCV04	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.83623	-104.30056	Jalisco	El Corcovado	Fruto, tallo, hoja
32	CRCV05	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.83623	-104.30056	Jalisco	El Corcovado	Fruto, tallo, hoja
33	CRCV06	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.83574	-104.29393	Jalisco	El Corcovado	Fruto, tallo, hoja
34	CRCV07	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.83574	-104.29393	Jalisco	El Corcovado	Fruto, tallo, hoja
35	CRCV08	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.83574	-104.29393	Jalisco	El Corcovado	Fruto, tallo, hoja
36	CRCV09	<i>Solanum nigrum</i>	19.83574	-104.29393	Jalisco	El Corcovado	Fruto, tallo, hoja
37	CRCV10	<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	19.83574	-104.29393	Jalisco	El Corcovado	Fruto, tallo, hoja
38	GZV01	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-	Veracruz	Gutiérrez Zamora	Fruto, tallo, hoja
39	JAL	<i>Solanum lycopersicum</i>	-	-	Jalisco	Tepec	Fruto, tallo, hoja

Tabla suplementaria 2 Lista de cepas bacterianas aisladas a partir de las muestras de plantas en estado silvestre. Se muestran las clasificaciones taxonómicas de los aislados desde género hasta orden en el caso de aquellos que fueron identificados mediante el análisis de la secuencia de la subunidad 16S del gen rRNA. En el caso de aquellos aislados analizados mediante el uso del marcador específico del género *Clavibacter* únicamente se muestra el resultado del uso de éste. El sombreado indica la coocurrencia de las cepas.

No.	Muestra origen	Cepa	Resultado 16S-rRNA	Familia	Orden	Marcador <i>Clavibacter</i>
1	PB1	PB1A	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
2		PB1B	-	-	-	Negativo
3		PB1C	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
4		PB1E	<i>Agrococcus</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
5	CF1	CF1A	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
6		CF1B	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
7		CF1C	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
8		CF1D	<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
9		CF1F	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
10		CF1H	<i>Okibacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
11		CF1I1	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
12		CF1I2	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
13	RA1	RA1A	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
14		RA1B	<i>Clavibacter</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
15		RA1C	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
16	RA2	RA2A	-	-	-	Negativo
17		RA2B1	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
18		RA2B2	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
19		RA2C	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
20		RA2D	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
21		RA2E	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
22		RA2F	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
23		RA2H	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
24	RA2I1	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-	

No.	Muestra origen	Cepa	Resultado 16S-rRNA	Familia	Orden	Marcador <i>Clavibacter</i>
25		RA2I2	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
26		RA2J1	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
27		RA2J2	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
28		INI01A	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
29		INI01B	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
30		INI01C	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
31		INI01D	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
32		INI01E	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Bacillales</i>	-
33		INI01F	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacteriales</i>	-
34		INI01H	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
35		INI01I	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
36		INI01J	<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacteriales</i>	-
37		INI01K	<i>Leifsonia</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
38		INI01L	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
39		INI01δ1A	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
40	INI01	INI01δ1B	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
41		INI01δ2A	<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
42		INI01δ2B	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
43		INI01δ3A	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
44		INI01δ3B	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
45		INI01δ4A	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
46		INI01δ4B	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
47		INI01δ4C	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
48		INI01εA	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
49		INI01εB	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
50		INI01εC	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
51		INI01εD	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
52	AUT01	AUT01A	<i>Agrococcus</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-

No.	Muestra origen	Cepa	Resultado 16S-rRNA	Familia	Orden	Marcador <i>Clavibacter</i>
53		AUT01B	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
54		AUT01C	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
55		AUT01E	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
56		AUT01F	<i>Agrococcus</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
57		AUT01G	<i>Kocuria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
58		AUT02A	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
59		AUT02B	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
60	AUT02	AUT02C	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
61		AUT02D	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
62		AUT02E	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
63		AUT03A	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
64		AUT03B	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
65	AUT03	AUT03C	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
66		AUT03D	<i>Frigoribacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
67		AUT03E	<i>Agrococcus</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
68		CZP01A	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
69		CZP01B	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
70		CZP01C	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
71	CZP01	CZP01D	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
72		CZP01E	<i>Plantibacter</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
73		CZP01F	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
74		CZP02A	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
75		CZP02B	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
76		CZP02C	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
77	CZP02	CZP02D	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
78		CZP02E	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
79		CZP02F	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
80		CZP02G	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
81	PB2	PB2A	-	-	-	Negativo

No.	Muestra origen	Cepa	Resultado 16S-rRNA	Familia	Orden	Marcador <i>Clavibacter</i>
82	ACJ01	ACJ01ηT A	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
83		ACJ01ηT B	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
84		ACJ01ηT C	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
85	RA03	RA03ηT A	<i>Pseudarthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
86		RA03ηT B	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
87		RA03ηT C	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
88		RA03ηT D	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
89		RA03ηT E	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
90		RA03ηT G	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
91		RA03ηT H	-	-	-	Negativo
92		RA03ηT J	<i>Labedella</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
93		RA03ηT R	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
94		RA03ηφ A	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
95		RA03ηφ B	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
96		RA03ηφ C	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
97		RA03ηφ D	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
98		RA03ηφ E	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
99		RA03ηφ F	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
100		RA03ηφ H	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
101		RA03ηφ K	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
102		RA03ηφ M	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
103	RA03ηφ N	<i>Paenarthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-	
104	RA03ηφ P	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-	
105	RA03ηφ S	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-	
106	RA03κφ A	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-	
107	RA03κφ B	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-	
108	RA03κφ C	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-	
109	RA03λT A	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-	

No.	Muestra origen	Cepa	Resultado 16S-rRNA	Familia	Orden	Marcador <i>Clavibacter</i>
110		RA03λτB	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
111		RA03λτC	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
112		RA03λτE	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
113		RA03λτG1.1	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
114		RA03λτG1.2	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
115		AY01B	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
116		AY01E	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
117		AY01F	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
118		AY01G	<i>Leucobacter</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
119	AY01	AY01H	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
120		AY01η4	<i>Luteococcus</i>	<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacteriales</i>	-
121		AY01ηA	-	-	-	Negativo
122		AY01ηB	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
123		AY01ηC	-	-	-	Negativo
124		AY02B	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
125		AY02C	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
126		AY02D	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
127		AY02E2	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
128	AY02	AY02ηA	<i>Arsenicococcus</i>	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
129		AY02ηB	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
130		AY02ηC	<i>Cellulomonas</i>	<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
131		AY02ηC	<i>Cellulomonas</i>	<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
132		AY02ηD	-	-	-	Negativo
133		AY02ηE	<i>Labedella</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
134		AY03A	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
135	AY03	AY03C	-	-	-	Negativo
136		AY03D	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
137		AY03ηA	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-

No.	Muestra origen	Cepa	Resultado 16S-rRNA	Familia	Orden	Marcador <i>Clavibacter</i>
138		AY03ηB	<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
139		AY03ηC	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
140		INI02A	-	-	-	Negativo
141		INI02B	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
142		INI02D	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
143		INI02E	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
144		INI02F	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
145		INI02G	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
146	INI02	INI02I	-	-	-	Negativo
147		INI02M	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
148		INI02N	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
149		INI02O	<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
150		INI02P	-	-	-	Negativo
151		INI02Q	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
152		INI02R	<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
153		INI02S	-	-	-	Negativo
154		INI03A	<i>Leucobacter</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
155		INI03B	-	-	-	Negativo
156		INI03C	<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
157		INI03D	<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
158		INI03E	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
159		INI03F	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
160	INI03	INI03G	-	-	-	Negativo
161		INI03H	-	-	-	Negativo
162		INI03I	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
163		INI03J	<i>Kocuria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
164		INI03K	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
165		INI03L	<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
166		INI03M	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-

No.	Muestra origen	Cepa	Resultado 16S-rRNA	Familia	Orden	Marcador <i>Clavibacter</i>
167		INI03N1	<i>Leucobacter</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
168		INI03N2	<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
169		INI04A	<i>Leucobacter</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
170		INI04B	-	-	-	Negativo
171		INI04C	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
172	INI04	INI04F	<i>Leucobacter</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
173		INI04K	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
174		INI04L	<i>Leucobacter</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
175		INI04M	-	-	-	Negativo
176	CNCH01.1	CNCH01.1A	<i>Citricoccus</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
177		CNCH01.1B	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
178		CNCH01.2A	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
179	CNCH01.2	CNCH01.2B	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
180		CNCH01.2C	<i>Rummeliibacillus</i>	<i>Planococcaceae</i>	<i>Bacillales</i>	-
181		CNCH01.2D	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
182	CNCH01.3	CNCH01.3A	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
183	CNCH01.4	CNCH01.4B	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
184		CNCH01.4D	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
185	AGC04	AGC04A	-	-	-	Negativo
186		AGC04B	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
187		CRCV02B	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
188		CRCV02C	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
189		CRCV02D	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
190	CRCV02	CRCV02E	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
191		CRCV02G	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
192		CRCV02H	-	-	-	Negativo
193		CRCV02I	<i>Kocuria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
194		CRCV02J	<i>Brevibacterium</i>	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
195	CRCV03	CRCV03A	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-

No.	Muestra origen	Cepa	Resultado 16S-rRNA	Familia	Orden	Marcador <i>Clavibacter</i>
196		CRCV03C	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
197		CRCV03E	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
198		CRCV03F	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
199		CRCV03G	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
200		CRCV05B	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
201	CRCV05	CRCV05C	-	-	-	Negativo
202		CRCV05D	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
203		CRCV06A	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
204	CRCB06	CRCV06B	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
205		CRCV06C	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
206		CRCV06E	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
207		CRCV07A	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
208		CRCV07B	-	-	-	Negativo
209	CRCV07	CRCV07C	-	-	-	Negativo
210		CRCV07D	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
211		CRCV07E	<i>Kocuria</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
212		CRCV09A	<i>Arthrobacter</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
213		CRCV09B	-	-	-	Negativo
214	CRCV09	CRCV09C	<i>Frigoribacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
215		CRCV09D	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
216		CRCV09E	-	-	-	Negativo
217		CRCV10A	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
218	CRCV10	CRCV10B	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
219		CRCV10C	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
220		GZV01A1.1	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
221		GZV01A1.2	-	-	-	Negativo
222	GZV01	GZV01A1.3	-	-	-	Negativo
223		GZV01A1.4	-	-	-	Negativo
224		GZV01A2	<i>Lysinimonas</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-

No.	Muestra origen	Cepa	Resultado 16S-rRNA	Familia	Orden	Marcador <i>Clavibacter</i>
225		GZV01A3	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
226		GZV01A4	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
227		GZV01B	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
228		GZV01C	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
229		GZV01D	<i>Frigoribacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
230		GZV01E	<i>Leucobacter</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
231		GZV01F	<i>Curtobacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
232		GZV01G	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
233		GZV01H	<i>Leucobacter</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
234		GZV01I	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
235		GZV01J	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
236		GZV01K	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
237		GZV01L	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
238		GZV01M	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
239		GZV01N	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
240		GZV01O	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
241		GZV01P	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Micrococcales</i>	-
242		JAL-01	-	-	-	Negativo
243		JAL-02	-	-	-	Negativo
244		JAL-03	-	-	-	Negativo
245		JAL-04	-	-	-	Negativo
246		JAL-05	-	-	-	Negativo
247	JAL	JAL-06.1	-	-	-	Negativo
248	JAL	JAL-06.2	-	-	-	Negativo
249		JAL-07	-	-	-	Negativo
250		JAL-08	-	-	-	Negativo
251		JAL-09	-	-	-	Negativo
252		JAL-10	-	-	-	Negativo
253		JAL-11	-	-	-	Negativo

No.	Muestra origen	Cepa	Resultado 16S-rRNA	Familia	Orden	Marcador <i>Clavibacter</i>
254		JAL-12	-	-	-	Negativo
255		JAL-13	-	-	-	Negativo
256		JAL-14	-	-	-	Negativo
257		JAL-15	-	-	-	Negativo
258		JAL-16	-	-	-	Negativo
259		JAL-17	-	-	-	Negativo
260		JAL-18	-	-	-	Negativo
261		JAL-19	-	-	-	Negativo
262		JAL-20	-	-	-	Negativo
263		JAL-21	-	-	-	Negativo
264		JAL-22	-	-	-	Negativo
265		JAL-23	-	-	-	Negativo
266		JAL-24	-	-	-	Negativo
267		JAL-25	-	-	-	Negativo
268		JAL-26	-	-	-	Negativo
269		JAL-27.1	-	-	-	Negativo
270		JAL-27.2	-	-	-	Negativo
271		JAL-28	-	-	-	Negativo
272		JAL-30	-	-	-	Negativo
273		JAL-31	-	-	-	Negativo
274		JAL-32	-	-	-	Negativo
275		JAL-33	-	-	-	Negativo

Tabla suplementaria 3 Cepas dentro de la base de datos genómica. Se muestra la especie de la cepa, su lugar de origen, año de aislamiento y fuente de aislamiento. En la fuente de aislamiento se indica la especie del organismo de donde se aisló la cepa, si no se indica una especie se especifica la fuente. En los casos en los que la fuente de aislamiento es *Solanum lycopersicum* se indica además la variedad de la planta si se tiene conocimiento de ésta. El sombreado de filas contiguas indica la coocurrencia de las cepas en un mismo hospedero.

No.	Especie	Cepa	Lugar de origen	Año de aislamiento	Fuente	Variedad (<i>S. lycopersicum</i>)	Acceso	Referencia
1	<i>Agreia pratensis</i>	VKM Ac-2510	Alemania	SD	SD	-	público	Kyrpides et al., 2014
2	<i>Agreia</i> sp.	VKM Ac-1783	Rusia	SD	SD	-	público	Vasilenko et al., 2018
3	<i>Agreia</i> sp.	VKM Ac-2052	Rusia	SD	SD	-	público	Kyrpides et al., 2014
4	<i>Agreia</i> sp.	AY2B8	EUA	SD	SD	-	público	Davis et al., 2018
5	<i>Clavibacter capsici</i>	PF008	Corea del Sur	2015	<i>Capsicum annum</i>	-	público	Oh et al., 2016
6	<i>Clavibacter</i> cf. <i>michiganensis</i>	LMG 26808	Países Bajos	SD	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	público	Zaluga et al., 2014
7	<i>Clavibacter insidiosus</i>	ATCC 10253	EUA	1960	<i>Medicago sativa</i>	-	público	Li & Yuan, 2017
8	<i>Clavibacter insidiosus</i>	LMG 3663	EUA	1955	<i>Medicago sativa</i>	-	público	Li & Yuan, 2017
9	<i>Clavibacter insidiosus</i>	R1-1	EUA	2009	<i>Medicago truncatula</i>	-	público	Lu et al., 2015
10	<i>Clavibacter insidiosus</i>	R1-3	EUA	2009	<i>Medicago truncatula</i>	-	público	Base de datos NCBI
11	<i>Clavibacter michiganensis</i>	AY1A6	EUA	2014	<i>Lolium perenne</i>	SD	público	Davis et al., 2018
12	<i>Clavibacter michiganensis</i>	AY1B2	EUA	2013	<i>Lolium perenne</i>	SD	público	Davis et al., 2018
13	<i>Clavibacter michiganensis</i>	AY1B3	EUA	2014	<i>Lolium multiflorum</i>	SD	público	Davis et al., 2018
14	<i>Clavibacter michiganensis</i>	CASJ009	EUA	2011	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	público	Thapa et al., 2017
15	<i>Clavibacter michiganensis</i>	CF11	China	2011	Suelo de invernadero	-	público	Du et al., 2015
16	<i>Clavibacter michiganensis</i>	CFBP7494	EUA	1999	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	público	Thapa et al., 2017
17	<i>Clavibacter michiganensis</i>	CFBP8017	Países Bajos	2006	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	público	Thapa et al., 2017
18	<i>Clavibacter michiganensis</i>	CFBP8019	Países Bajos	SD	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	público	Thapa et al., 2017
19	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Z001	EUA	2012	<i>Dactylis glomerata</i>	-	público	Davis et al., 2018

No.	Especie	Cepa	Lugar de origen	Año de aislamiento	Fuente	Variedad (S. lycopersicum)	Acceso	Referencia
20	<i>Clavibacter michiganensis</i>	Z002	EUA	2012	<i>Dactylis glomerata</i>	-	público	Davis et al., 2018
21	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CA00001	EUA	2000	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	público	Thapa et al., 2017
22	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CA00002	EUA	2000	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	público	Thapa et al., 2017
23	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CASJ001	EUA	1999	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	público	Thapa et al., 2017
24	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CASJ002	EUA	1999	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	público	Thapa et al., 2017
25	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CASJ006	EUA	2002	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	público	Thapa et al., 2017
26	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CASJ007	EUA	2011	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	público	Thapa et al., 2017
27	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CASJ008	EUA	2002	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	público	Thapa et al., 2017
28	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	CAYO001	EUA	2001	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	público	Thapa et al., 2017
29	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	NCPPB 382	Reino Unido	1956	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	público	Gartemann et al., 2008
30	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	VKM Ac-1403	Hungría	1957	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	público	Base de datos NCBI
31	<i>Clavibacter nebraskensis</i>	DOAB 395	Canadá	2014	<i>Zea mays</i>	-	público	Base de datos NCBI
32	<i>Clavibacter nebraskensis</i>	DOAB 397	Canadá	2014	<i>Zea mays</i>	-	público	Tambong et al., 2015
33	<i>Clavibacter nebraskensis</i>	NCPPB 2581	EUA	1971	<i>Zea mays</i>	-	público	Base de datos NCBI
34	<i>Clavibacter sepedonicus</i>	ATCC33113	Canadá	1948	<i>Solanum tuberosum</i>	-	público	Bentley et al., 2008
35	<i>Clavibacter sepedonicus</i>	CFIA-Cs3N	Canadá	SD	<i>Solanum tuberosum</i>	-	público	Li & Yuan, 2017
36	<i>Clavibacter sepedonicus</i>	CFIA-CsR14	Canadá	SD	<i>Solanum tuberosum</i>	-	público	Li & Yuan, 2017
37	<i>Clavibacter</i> sp.	199	EUA	SD	<i>Sorghum spp.</i>	-	público	Base de datos NCBI
38	<i>Clavibacter tessellarius</i>	ATCC 33566	EUA	1976	<i>Triticum aestivum</i>	-	público	Li & Yuan, 2017
39	<i>Clavibacter tessellarius</i>	DOAB 609	EUA	1976	<i>Triticum aestivum</i>	-	público	Base de datos NCBI
40	<i>Curtobacterium</i> sp.	314Chir4.1	SD	SD	SD	-	público	Base de datos NCBI

No.	Especie	Cepa	Lugar de origen	Año de aislamiento	Fuente	Variedad (S. lycopersicum)	Acceso	Referencia
41	<i>Curtobacterium</i> sp.	UNCCL20	SD	SD	SD	-	público	Base de datos NCBI
42	<i>Curtobacterium</i> sp.	YR515	SD	SD	SD	-	público	Base de datos NCBI
43	<i>Microbacterium agarici</i>	DSM 21798	Taiwan	SD	<i>Agaricus blazei</i>	-	público	Young et al., 2010
44	<i>Microbacterium oleivorans</i>	Wellendorf	EUA	SD	<i>Manija de puerta</i>	-	público	Avramov et al., 2016
45	<i>Micrococcus</i> sp.	FDAARGOS_33 3	SD	SD	<i>Homo sapiens</i>	-	público	Base de datos NCBI
46	<i>Micrococcus luteus</i>	FDAARGOS_40 6	SD	SD	<i>Homo sapiens</i>	-	público	Base de datos NCBI
47	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	322	Chile	2005	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	privado	Valenzuela et al., 2018
48	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	P3	Chile	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	SD	privado	Valenzuela et al., 2018
49	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR1	Guanajuato	2010	<i>Solanum lycopersicum</i>	Komeett	privado	Colección del EvoDivMet
50	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR2	Guanajuato	2010	<i>Solanum lycopersicum</i>	Clermon	privado	Colección del EvoDivMet
51	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR4	Guanajuato	2010	<i>Solanum lycopersicum</i>	Clermon	privado	Colección del EvoDivMet
52	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR8	Guanajuato	2011	<i>Solanum lycopersicum</i>	Clermon	privado	Colección del EvoDivMet
53	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR9	Guanajuato	2011	<i>Solanum lycopersicum</i>	Clermon	privado	Colección del EvoDivMet
54	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR43	Guanajuato	2011	<i>Solanum lycopersicum</i>	Komeett	privado	Colección del EvoDivMet
55	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR79	Guanajuato	2013	<i>Solanum lycopersicum</i>	Clermon	privado	Colección del EvoDivMet
56	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR87-6	Guanajuato	2013	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bigdena	privado	Colección del EvoDivMet
57	<i>Microbacterium</i> sp.	AeR87-7	Guanajuato	2013	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bigdena	privado	Colección del EvoDivMet
58	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR93	Guanajuato	2013	<i>Solanum lycopersicum</i>	Bigdena	privado	Colección del EvoDivMet
59	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR96-1	Guanajuato	2013	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
60	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR96-2	Guanajuato	2013	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
61	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR97-1	Guanajuato	2013	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet

No.	Especie	Cepa	Lugar de origen	Año de aislamiento	Fuente	Variedad (S. lycopersicum)	Acceso	Referencia
62	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR99-1	Guanajuato	2013	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
63	<i>Micrococcus</i> sp.	AeR106-1	Guanajuato	2014	<i>Solanum lycopersicum</i>	Komeett	privado	Colección del EvoDivMet
64	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR106-3	Guanajuato	2014	<i>Solanum lycopersicum</i>	Komeett	privado	Colección del EvoDivMet
65	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR111	Guanajuato	2014	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
66	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR112	Guanajuato	2014	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
67	<i>Microbacterium</i> sp.	AeR125A	Guanajuato	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
68	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR125H	Guanajuato	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
69	<i>Micrococcus</i> sp.	AeR127B	Guanajuato	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
70	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR129B	Guanajuato	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
71	<i>Microbacterium</i> sp.	AeR129F-1	Guanajuato	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
72	<i>Curtobacterium</i> sp.	AeR129F-2	Guanajuato	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
73	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AeR130I	Guanajuato	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
74	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AL2A	Zacatecas	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
75	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AL2B	Zacatecas	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
76	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AL3A	Zacatecas	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
77	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AL3D	Zacatecas	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
78	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AM2A	Michoacán	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
79	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AM2B	Michoacán	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
80	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AM3A	Michoacán	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
81	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AM3B	Michoacán	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
82	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AM4B	Michoacán	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet

No.	Especie	Cepa	Lugar de origen	Año de aislamiento	Fuente	Variedad (S. lycopersicum)	Acceso	Referencia
83	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AM4C	Michoacán	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
84	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	AM5C	Michoacán	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
85	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	GV23M	Nuevo León	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
86	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	GV23O	Nuevo León	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
87	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	GV23P	Nuevo León	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
88	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	GV23Q	Nuevo León	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
89	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	HF6A	Querétaro	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
90	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	HF8B	Querétaro	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Torero	privado	Colección del EvoDivMet
91	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	INP10B	Guanajuato	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
92	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	INP10C	Guanajuato	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
93	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	INP12A	Guanajuato	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
94	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	INP12B	Guanajuato	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
95	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	INP12C	Guanajuato	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
96	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	INP12D	Guanajuato	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
97	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	K112	Guanajuato	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Komeett	privado	Colección del EvoDivMet
98	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	K115	Guanajuato	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Komeett	privado	Colección del EvoDivMet
99	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	M113	Guanajuato	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
100	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	M212	Guanajuato	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
101	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	MK3A	Aguascalientes	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
102	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	MK3B	Aguascalientes	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
103	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	MK3C	Aguascalientes	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet

No.	Especie	Cepa	Lugar de origen	Año de aislamiento	Fuente	Variedad (S. lycopersicum)	Acceso	Referencia
104	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	MK3C2	Aguascalientes	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
105	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	MK3D	Aguascalientes	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
106	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	NS32A	Colima	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Sunburst	privado	Colección del EvoDivMet
107	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	NS32B	Colima	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Sunburst	privado	Colección del EvoDivMet
108	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	OL5B	Guanajuato	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Dunne	privado	Colección del EvoDivMet
109	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	OL5C	Guanajuato	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Dunne	privado	Colección del EvoDivMet
110	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	PS35SC	Guanajuato	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Castlemart	privado	Colección del EvoDivMet
111	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	RG2C	Jalisco	2017	<i>Solanum lycopersicum</i>	Campari	privado	Colección del EvoDivMet
112	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	RS6C	Guanajuato	2018	<i>Solanum lycopersicum</i>	Komeett	privado	Colección del EvoDivMet
113	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	SC3C	Michoacán	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
114	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	SC3F	Michoacán	2015	<i>Solanum lycopersicum</i>	Merlice	privado	Colección del EvoDivMet
115	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	SPR2D	Guanajuato	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Castlemart	privado	Colección del EvoDivMet
116	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	VP9A	Querétaro	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Forontti	privado	Colección del EvoDivMet
117	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	VP9C	Querétaro	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Forontti	privado	Colección del EvoDivMet
118	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	WTD	Guanajuato	2016	<i>Solanum lycopersicum</i>	Castlemart	privado	Colección del EvoDivMet
119	<i>Microbacterium</i> sp.	RA1A	Guanajuato	2017	<i>Solanum lycopersicum</i>	Silvestre	privado	Este trabajo
120	<i>Clavibacter capsici</i>	RA1B	Guanajuato	2017	<i>Solanum lycopersicum</i>	Silvestre	privado	Este trabajo
121	<i>Microbacterium</i> sp.	RA1C	Guanajuato	2017	<i>Solanum lycopersicum</i>	Silvestre	privado	Este trabajo

SD: sin datos.

EvoDivMet: Laboratorio de Evolución de la Diversidad Metabólica

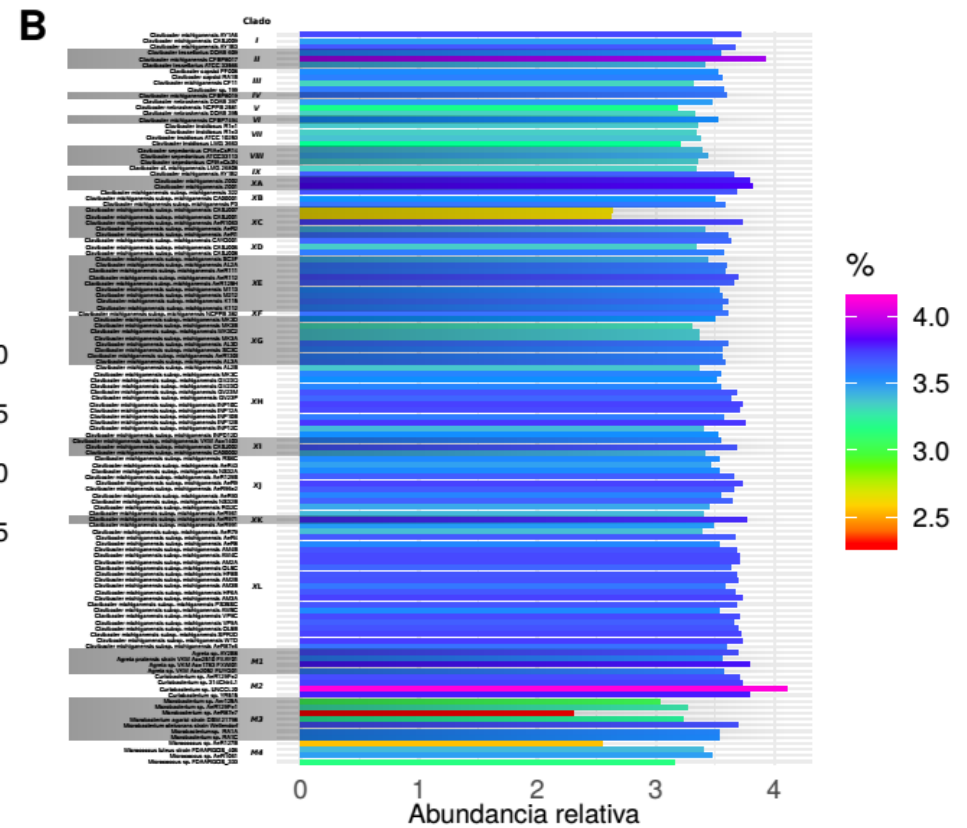
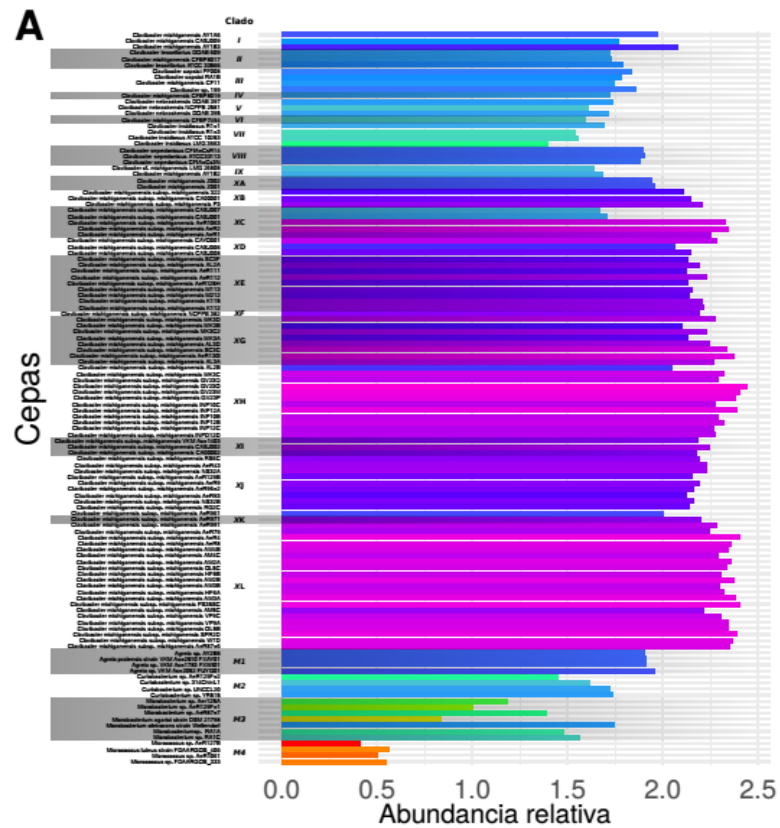


Figura suplementaria 1 Abundancia relativa de PCWDE (A) y proteasas (B) en los genomas analizados del género *Clavibacter* y géneros cercanos. Las barras se encuentran ordenadas conforme a las filogenias de las figuras 6 y 7, y agrupadas por género en el caso de las cepas que no son de *Clavibacter*. A la derecha del nombre de cada cepa se indica el clado o subclado en el que se encuentran agrupadas.

13. BIBLIOGRAFÍA

Akhter, Y., Ahmed, I., Devi, S., & Ahmed, N. (2007). The co-evolved *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Trinity of bacterial virulence, host susceptibility and lifestyle. *Infectious Agents and Cancer*, 2(1), 2. doi:10.1186/1750-9378-2-2

Alberta Ministry of Agriculture and Forestry. (2004, January 3). Commercial Greenhouse Tomato Production: Tomato Plant Propagation.

Atherton, J. C., & Blaser, M. J. (2009). Coadaptation of *Helicobacter pylori* and humans: ancient history, modern implications. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2475–87. doi:10.1172/JCI38605

Avramov, A., Couger, M. B., Hartley, E., Land, C., Wellendorf, R., Hanafy, R., Youssef, N. et al. (2016). Draft genome sequence of *Microbacterium oleivorans* strain Wellendorf implicates heterotrophic versatility and bioremediation potential. *Genomics Data*, 10, 54–60. doi:10.1016/j.gdata.2016.09.005

Aziz, R., Bartels, D., Best, A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R., Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics*, 9(1), 75. doi:10.1186/1471-2164-9-75

Bae, C., Han, S., Song, Y.-R., Kim, B.-Y., Lee, H.-J., Lee, J.-M., Oh, C.-S. (2015). Infection processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(7), 1219–1229. doi:10.1007/s00122-015-2521-1

Bar-On, Y., Phillips, R., & Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 115(25), 201711842. doi:10.1073/pnas.1711842115

Baroncelli, R., Amby, D., Zapparata, A., Sarrocco, S., Vannacci, G., Floch, G., Thon, M. (2016). Gene family expansions and contractions are associated with host range in plant pathogens of the genus *Colletotrichum*. *BMC Genomics*, 17(1), 555. doi:10.1186/s12864-016-2917-6

Behrendt, U. (2002). Diversity of grass-associated Microbacteriaceae isolated from the phyllosphere and litter layer after mulching the sward; polyphasic characterization of *Subtercola pratensis* sp. nov., *Curtobacterium herbarum* sp. nov. and *Plantibacter flavus* gen. nov., sp. nov. *International Journal Of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(5), 1441–1454. doi:10.1099/ijs.0.02138-0

Beimen, A., Bermpohl, A., Meletzus, D., Eichenlaub, R., & Barz, W. (1992). Accumulation of phenolic compounds in leaves of tomato plants after infection with *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* strains differing in virulence. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 47(11-12), 898–909.

Bella, P., Ialacci, G., Licciardello, G., & Rosa, L. R. (2012). Characterization of atypical *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* populations in greenhouse tomatoes in Italy. *Journal of Plant Pathology* Retrieved from <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/2646>

Bendtsen, J., Nielsen, H., Widdick, D., Palmer, T., & Brunak, S. (2005). Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics*, 6(1), 167. doi:10.1186/1471-2105-6-167

Bentley, S., Corton, C., Brown, S., Barron, A., Clark, L., Doggett, J., Ishimaru, C. (2008). Genome of the Actinomycete Plant Pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* Suggests Recent Niche Adaptation. *Journal of Bacteriology*, 190(6), 2150–2160. doi:10.1128/JB.01598-07

Bentley, S. D., & Parkhill, J. (2015). Genomic perspectives on the evolution and spread of bacterial pathogens. *Proceedings. Biological Sciences*, 282(1821), 20150488. doi:10.1098/rspb.2015.0488

Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32(1), 170–189. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.11.003

- Bermpohl, A., Dreier, J., Bahro, R., & Eichenlaub, R. (1996). Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. *Microbiological Research*, 151(4), 391–399. doi:10.1016/S0944-5013(96)80009-7
- Blanca, J., Cañizares, J., Cordero, L., Pascual, L., Diez, M., & Nuez, F. (2012). Variation Revealed by SNP Genotyping and Morphology Provides Insight into the Origin of the Tomato. *PLoS ONE*, 7(10), e48198. doi:10.1371/journal.pone.0048198
- Bleuven, C., & Landry, C. (2016). Molecular and cellular bases of adaptation to a changing environment in microorganisms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1841), 20161458. doi:10.1098/rspb.2016.1458
- Bobay, L.-M., & Ochman, H. (2017). The Evolution of Bacterial Genome Architecture. *Frontiers in Genetics*, 8, 72. doi:10.3389/fgene.2017.00072
- Bolger, A., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
- Bowden, S., Eyres, A., Chung, J., Monson, R., Thompson, A., Salmond, G., Welch, M. (2013). Virulence in *Pectobacterium atrosepticum* is regulated by a coincidence circuit involving quorum sensing and the stress alarmone, (p)ppGpp. *Molecular Microbiology*, 90(3), 457–471. doi:10.1111/mmi.12369
- Bredon, M., Dittmer, J., Noël, C., Moumen, B., & Bouchon, D. (2018). Lignocellulose degradation at the holobiont level: teamwork in a keystone soil invertebrate. *Microbiome*, 6(1), 162. doi:10.1186/s40168-018-0536-y
- Busse, H. (2015). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–3). doi:10.1002/9781118960608.obm00014
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), 540–52. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334
- Chalupowicz, L., Barash, I., Reuven, M., Dror, O., Sharabani, G., Gartemann, K., Manulis-Sasson, S. (2017). Differential contribution of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* virulence factors to systemic and local infection in tomato. *Molecular Plant Pathology*, 18(3), 336–346. doi:10.1111/mpp.12400
- Chalupowicz, L., Cohen-Kandli, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K., Sessa, G., Manulis-Sasson, S. (2010). Sequential Expression of Bacterial Virulence and Plant Defense Genes During Infection of Tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 100(3), 252–261. doi:10.1094/PHYTO-100-3-0252
- Chang, J., Desveaux, D., & Creason, A. (2014). The ABCs and 123s of Bacterial Secretion Systems in Plant Pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 317–345. doi:10.1146/annurev-phyto-011014-015624
- Cho, I., & Blaser, M. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 260–270. doi:10.1038/nrg3182
- Cole, J., Wang, Q., Fish, J., Chai, B., McGarrell, D., Sun, Y., Tiedje, J. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D633–D642. doi:10.1093/nar/gkt1244
- Cosgrove, D. (2016). Plant cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall-modifying enzymes. *Journal of Experimental Botany*, 67(2), 463–476. doi:10.1093/jxb/erv511
- Croce, V., Pianzola, M., Durand, K., González-Arcos, M., Jacques, M.-A., & Siri, M. (2016). Multilocus Sequence Typing reveals high variability among *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

- strains affecting tomato crops in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, 144(1), 1–13. doi:10.1007/s10658-015-0738-0
- Davis, E., Tabima, J., Weisberg, A., Lopes, L., Wiseman, M., Wiseman, M., Chang, J. (2018). Evolution of the U.S. Biological Select Agent *Rathayibacter toxicus*. *mBio*, 9(4), e01280–18. doi:10.1128/mBio.01280-18
- De Pinto, M. C., Lavermicocca, P., Evidente, A., Corsaro, M. M., Lazzaroni, S., & De Gara, L. (2003). Exopolysaccharides produced by plant pathogenic bacteria affect ascorbate metabolism in *Nicotiana tabacum*. *Plant & Cell Physiology*, 44(8), 803–10.
- Dhanjal, S., Kaur, I., Korpole, S., Schumann, P., Cameotra, S., Pukall, R., Mayilraj, S. (2011). *Agrococcus carbonis* sp. nov., isolated from soil of a coal mine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(6), 1253–1258. doi:10.1099/ij.s.0.024745-0
- Diaconu, S., Predescu, A., Moldoveanu, A., Pop, C. S., & Fierbințeanu-Braticevici, C. (2017). *Helicobacter pylori* infection: old and new. *Journal of Medicine and Life*, 10(2), 112–117.
- Dreier, J., Meletzus, D., & Eichenlaub, R. (1997). Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 10(2), 195–206. doi:10.1094/MPMI.1997.10.2.195
- Dutta, C., & Paul, S. (2012). Microbial Lifestyle and Genome Signatures. *Current Genomics*, 13(2), 153–162. doi:10.2174/138920212799860698
- Eddy, S. (1998). Profile hidden Markov models. *Bioinformatics*, 14(9), 755–763. doi:10.1093/bioinformatics/14.9.755
- Eddy, S. R. (2009). A new generation of homology search tools based on probabilistic inference. *Genome Informatics. International Conference on Genome Informatics*, 23(1), 205–11.
- Eddy, S. R. (2011). Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Computational Biology*, 7(10), e1002195. doi:10.1371/journal.pcbi.1002195
- Edgar, R. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. doi:10.1093/nar/gkh340
- Eichenlaub, R., & Gartemann, K.-H. (2011). The *Clavibacter michiganensis* Subspecies: Molecular Investigation of Gram-Positive Bacterial Plant Pathogens. *Phytopathology*, 49(1), 445–464. doi:10.1146/annurev-phyto-072910-095258
- Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H., & Burger, A. (2006). *Clavibacter michiganensis*, a group of gram-positive phytopathogenic bacteria. *Plant-Associated Bacteria* (pp. 385–421). Springer. doi:10.1007/978-1-4020-4538-7_12
- Flügel, M., Becker, A., Gartemann, K.-H., & Eichenlaub, R. (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), 42–54. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.01.023
- Franza, T., & Expert, D. (2013). Role of iron homeostasis in the virulence of phytopathogenic bacteria: an “à la carte” menu. *Molecular Plant Pathology*, 14(4), 429–438. doi:10.1111/mpp.12007
- Gartemann, K.-H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., ... Bartels, D. (2008). The Genome Sequence of the Tomato-Pathogenic Actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 Reveals a Large Island Involved in Pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, 190(6), 2138–2149. doi:10.1128/JB.01595-07

- Gitaitis, R.D., Beaver, R.W., & Disease, V.-A. (1991). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease*. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19912311178>
- Gopal, M., & Gupta, A. (2016). Microbiome Selection Could Spur Next-Generation Plant Breeding Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1971. doi:10.3389/fmicb.2016.01971
- Grenfell, B., Pybus, O., Gog, J., Wood, J., Daly, J., Mumford, J., & Holmes, E. (2004). Unifying the Epidemiological and Evolutionary Dynamics of Pathogens. *Science*, 303(5656), 327–332. doi:10.1126/science.1090727
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 763–81. doi:10.1007/s00253-004-1568-8
- Gutiérrez-García, K., Bustos-Díaz, E. D., Corona-Gómez, J. A. A., Ramos-Aboites, H. E., Sélem-Mojica, N., Cruz-Morales, P., ... Cibrián-Jaramillo, A. (2018). Cycad coralloid roots contain bacterial communities including cyanobacteria and *Caulobacter* spp that encode niche-specific biosynthetic gene clusters. *Genome Biology and Evolution*. doi:10.1093/gbe/evy266
- Haas, H., Eisendle, M., & Turgeon, B. G. (2008). Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annual Review of Phytopathology*, 46, 149–87. doi:10.1146/annurev.phyto.45.062806.094338
- Han, S., Nedashkovskaya, O., Mikhailov, V., Kim, S., & Bae, K. (2003). *Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family Microbacteriaceae from the marine environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 2061–2066. doi:10.1099/ijs.0.02627-0
- Hardoim, P., & Hardoim, C. (2017). *Endophytes: Biology and Biotechnology* (Vol. 15, pp. 99–125). doi:10.1007/978-3-319-66541-2_5
- Hiery, E., Poetsch, A., Moosbauer, T., Amin, B., Hofmann, J., & Burkovski, A. (2015). A Proteomic Study of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Culture Supernatants. *Proteomes*, 3(4), 411–423. doi:10.3390/proteomes3040411
- Hird, S., Sánchez, C., Carstens, B., & Brumfield, R. (2015). Comparative Gut Microbiota of 59 Neotropical Bird Species. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1403. doi:10.3389/fmicb.2015.01403
- Ho, A., Lonardo, D., & Bodelier, P. (2017). Revisiting life strategy concepts in environmental microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, fix006. doi:10.1093/femsec/fix006
- Hooi, J., Lai, W., Ng, W., Suen, M., Underwood, F., Tanyingoh, D., ... Ng, S. (2017). Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*, 153. doi:10.1053/j.gastro.2017.04.022
- Huelsenbeck, J., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754–755. doi:10.1093/bioinformatics/17.8.754
- Hwang, I., Oh, E., Kim, D., & Oh, C. (2018). Multiple plasmid-borne virulence genes of *Clavibacter michiganensis* ssp. *capsici* critical for disease development in pepper. *New Phytologist*, 217(3), 1177–1189. doi:10.1111/nph.14896
- Hwang, I., Oh, E.-J., Lee, H., & Oh, C.-S. (2018). Functional characterization of two cellulase genes in the Gram-positive pathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* for wilting in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. doi:10.1094/MPMI-08-18-0227-R
- Hönigschmid, P., Bykova, N., Schneider, R., Ivankov, D., & Frishman, D. (2018). Evolutionary interplay between symbiotic relationships and patterns of signal peptide gain and loss. *Genome Biology and Evolution*, evy049–. doi:10.1093/gbe/evy049

- Imam, J., Singh, P., & Shukla, P. (2016). Plant Microbe Interactions in Post Genomic Era: Perspectives and Applications. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1488. doi:10.3389/fmicb.2016.01488
- Jacques, M.-A., Durand, K., Orgeur, G., Balidas, S., Fricot, C., Bonneau, S., Mathis, R. (2012). Phylogenetic Analysis and Polyphasic Characterization of *Clavibacter michiganensis* Strains Isolated from Tomato Seeds Reveal that Nonpathogenic Strains Are Distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8388–8402. doi:10.1128/AEM.02158-12
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., & Eichenlaub, R. (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), 703–14. doi:10.1094/MPMI.2000.13.7.703
- Karpinets, T., Park, B., Syed, M., Klotz, M., & Uberbacher, E. (2014). Metabolic Environments and Genomic Features Associated with Pathogenic and Mutualistic Interactions Between Bacteria and Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(7), 664–677. doi:10.1094/MPMI-12-13-0368-R
- Kaup, O., Gräfen, I., Zellermann, E.-M. M., Eichenlaub, R., & Gartemann, K.-H. H. (2005). Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPB382. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 18(10), 1090–8. doi:10.1094/MPMI-18-1090
- Kawaguchi, Tanina, & Inoue. (2010). Molecular typing and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouses in Japan. *Plant Pathology*, 59(1), 76–83. doi:10.1111/j.1365-3059.2009.02207.x
- King, B., Waxman, K., Nenni, N., Walker, L., Bergstrom, G., & Gibson, D. (2011). Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), 4. doi:10.1186/1754-6834-4-4
- Kleitman, F., Barash, I., Burger, A., Iraki, N., Falah, Y., Sessa, G., Manulis-Sasson, S. (2008). Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *European Journal of Plant Pathology*, 121(4), 463–475. doi:10.1007/s10658-007-9264-z
- Klemm, E., & Dougan, G. (2016). Advances in Understanding Bacterial Pathogenesis Gained from Whole-Genome Sequencing and Phylogenetics. *Cell Host & Microbe*, 19(5), 599–610. doi:10.1016/j.chom.2016.04.015
- Koeck, M., Hardham, A., & Dodds, P. (2011). The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cellular Microbiology*, 13(12), 1849–1857. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01665.x
- Kubicek, C., Starr, T., & Glass, L. (2014). Plant Cell Wall–Degrading Enzymes and Their Secretion in Plant-Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 52(1), 427–451. doi:10.1146/annurev-phyto-102313-045831
- Kuşçu, H., Turhan, A., & Demir, A. (2014). The response of processing tomato to deficit irrigation at various phenological stages in a sub-humid environment. *Agricultural Water Management*, 133, 92–103. doi:10.1016/j.agwat.2013.11.008
- Kyrpides, N., Hugenholtz, P., Eisen, J., Woyke, T., Göker, M., Parker, C., ... Klenk, H.-P. (2014). Genomic Encyclopedia of Bacteria and Archaea: Sequencing a Myriad of Type Strains. *PLoS Biology*, 12(8), e1001920. doi:10.1371/journal.pbio.1001920
- Lampugnani, E., Khan, G., Somssich, M., & Persson, S. (2018). Building a plant cell wall at a glance. *J Cell Sci*, 131(2), jcs207373. doi:10.1242/jcs.207373
- Land, M., Hauser, L., Jun, S.-R., Nookaew, I., Leuze, M., Ahn, T.-H., ... Ussery, D. (2015). Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional & Integrative Genomics*, 15(2), 141–161. doi:10.1007/s10142-015-0433-4

- Li, L., Stoeckert, C., & Roos, D. (2003). OrthoMCL: Identification of Ortholog Groups for Eukaryotic Genomes. *Genome Research*, 13(9), 2178–2189. doi:10.1101/gr.1224503
- Li, X. S., & Yuan, X. K. (2017). Genome Sequences for Multiple *Clavibacter* Strains from Different Subspecies. *Genome Announcements*, 5(38). doi:10.1128/genomeA.00721-17
- Li, X., Tambong, J., Yuan, K., Chen, W., Xu, H., Lévesque, C., & Boer, S. (2017). Re-classification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1), 234–240. doi:10.1099/ijsem.0.002492
- Lombard, V., Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P., & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D490–D495. doi:10.1093/nar/gkt1178
- Lu, Y., Samac, D., Glazebrook, J., & Ishimaru, C. (2015). Complete Genome Sequence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* R1-1 Using PacBio Single-Molecule Real-Time Technology. *Genome Announcements*, 3(3), e00396–15. doi:10.1128/genomeA.00396-15
- Maffei, B., Francetic, O., & Subtil, A. (2017). Tracking Proteins Secreted by Bacteria: What's in the Toolbox? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 221. doi:10.3389/fcimb.2017.00221
- Martin, M. E., & Solnick, J. V. (2014). The gastric microbial community, *Helicobacter pylori* colonization, and disease. *Gut Microbes*, 5(3), 345–50. doi:10.4161/gmic.28573
- Meletzus, D., Bermphol, A., Dreier, J., & Eichenlaub, R. (1993). Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Journal of Bacteriology*, 175(7), 2131–6. doi:10.1128/jb.175.7.2131-2136.1993
- Milijašević-Marčić, S., Gartemann, K.-H., Frohwitter, J., Eichenlaub, R., Todorović, B., Rekanović, E., & Potočnik, I. (2012). Characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Serbia. *European Journal of Plant Pathology*, 134(4), 697–711. doi:10.1007/s10658-012-0046-x
- Mrginean, M., Mrginean, C., Meli, L., Voidzan, S., Moldovan, V., & Bnescu, C. (2017). The impact of host's genetic susceptibility on *Helicobacter pylori* infection in children. *Medicine*, 96(30), e7612. doi:10.1097/MD.00000000000007612
- Nangare, D. D., Singh, Y., Kumar, P., & Minhas, P. S. (2016). Growth, fruit yield and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by deficit irrigation regulated on phenological basis. *Agricultural Water Management*, 171, 73–79. doi:10.1016/j.agwat.2016.03.016
- Newton, A., Fitt, B., Atkins, S., Walters, D., & Daniell, T. (2010). Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe–plant interactions. *Trends in Microbiology*, 18(8), 365–373. doi:10.1016/j.tim.2010.06.002
- Nouioui, I., Carro, L., García-López, M., Meier-Kolthoff, J., Woyke, T., Kyrpides, N., ... Göker, M. (2018). Genome-Based Taxonomic Classification of the Phylum Actinobacteria. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2007. doi:10.3389/fmicb.2018.02007
- Oh, E.-J., Hwang, I., Yea, M., Lee, H.-B., Oh, C.-S., Bae, C., ... Yim, K.-O. (2016). *Clavibacter michiganensis* subsp. *capsici* subsp. nov., causing bacterial canker disease in pepper. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. doi:10.1099/ijsem.0.001311
- Ohm, R., Feau, N., Henrissat, B., Schoch, C., Horwitz, B., Barry, K., ... Grigoriev, I. (2012). Diverse Lifestyles and Strategies of Plant Pathogenesis Encoded in the Genomes of Eighteen Dothideomycetes Fungi. *PLoS Pathogens*, 8(12), e1003037. doi:10.1371/journal.ppat.1003037

- Olsson, L., Christensen, T., Hansen, K., & Palmqvist, E. (2003). Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(5), 612–619. doi:10.1016/S0141-0229(03)00181-9
- Osdaghi, E., Ansari, M., Taghavi, S., Zarei, S., Koebnik, R., & Lamichhane, J. (2018). Pathogenicity and phylogenetic analysis of *Clavibacter michiganensis* strains associated with tomato plants in Iran. *Plant Pathology*, 67(4), 957–970. doi:10.1111/ppa.12801
- O'Neill, T., & Mayne, S. (2014). Tomato bacterial wilt and canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) (No. TR-PE 002) [Technical review] (pp. 1–8). Horticultural Development Company.
- Paetzel, M., Karla, A., Strynadka, N., & Dalbey, R. (2002). Signal Peptidases. *Chemical Reviews*, 102(12), 4549–4580. doi:10.1021/cr010166y
- Pallen, M., & Wren, B. (2007). Bacterial pathogenomics. *Nature*, 449(7164), 835–842. doi:10.1038/nature06248
- Pan, X., Yang, Y., & Zhang, J.-R. (2014). Molecular basis of host specificity in human pathogenic bacteria. *Emerging Microbes & Infections*, 3(3), emi201423. doi:10.1038/emi.2014.23
- Parvej, M., Khan, M., & Awal, M. (2010). Phenological Development and Production Potentials of Tomato under Polyhouse Climate. *Journal of Agricultural Sciences*, 5(1), 19–31. doi:10.4038/jas.v5i1.2329
- Peet, M., & Welles, G. (2005). Greenhouse tomato production. *Tomatoes* (1st ed., pp. 257–304). doi:10.1079/9780851993966.0257
- Petersen, T., Brunak, S., Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785. doi:10.1038/nmeth.1701
- Popper, Z. (2008). Evolution and diversity of green plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 286–292. doi:10.1016/j.pbi.2008.02.012
- Pybus, O., & Rambaut, A. (2009). Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nature Reviews Genetics*, 10(8), 540–550. doi:10.1038/nrg2583
- Pérez-Jaramillo, J., Mendes, R., & Raaijmakers, J. (2016). Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. *Plant Molecular Biology*, 90(6), 635–644. doi:10.1007/s11103-015-0337-7
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Glöckner, F. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596. doi:10.1093/nar/gks1219
- Rawlings, N., Barrett, A., Thomas, P., Huang, X., Bateman, A., & Finn, R. (2018). The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Research*, gkx1134–. doi:10.1093/nar/gkx1134
- Rodríguez Orduña, L. (2016). *Microbioma del jitomate: determinante en la infección por Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional - Unidad de Genómica Avanzada, Irapuato, Guanajuato.
- Roldán-Arjona, T., Pérez-Espinosa, A., & Ruiz-Rubio, M. (1999). Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* defines a new class of saponinases. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 12(10), 852–61. doi:10.1094/MPMI.1999.12.10.852
- Ronquist, F., Teslenko, M., Mark, P., Ayres, D., Darling, A., Höhna, S., Huelsenbeck, J. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. doi:10.1093/sysbio/sys029

- Rosebury, T. (1962). *Microorganisms indigenous to man* (p. 435). New York: McGraw-Hill.
- Savidor, A., Chalupowicz, L., Teper, D., Gartemann, K.-H. H., Eichenlaub, R., Manulis-Sasson, S., ... Sessa, G. (2014). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Vatr1 and Vatr2 transcriptional regulators are required for virulence in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(10), 1035–47. doi:10.1094/MPMI-02-14-0061-R
- Savidor, A., Teper, D., Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R., Chalupowicz, L., Manulis-Sasson, S., Sessa, G. (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), 736–750. doi:10.1021/pr200646a
- Seipke, R., & Loria, R. (2008). *Streptomyces scabies* 87-22 Possesses a Functional Tomatinase ν . *Journal of Bacteriology*, 190(23), 7684–7692. doi:10.1128/JB.01010-08
- Sen, Y, van der Wolf, J, & Visser, R. (2015). Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance, and interactions. *Plant ...* Retrieved from <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-05-14-0499-FE>
- Sharabani, Shtienberg, Borenstein, Shulhani, Lofthouse, Sofer, Manulis-Sasson. (2013). Effects of plant age on disease development and virulence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato. *Plant Pathology*, 62(5), 1114–1122. doi:10.1111/ppa.12013
- Simon, M., Scheuner, C., Meier-Kolthoff, J., Brinkhoff, T., Wagner-Döbler, I., Ulbrich, M., Göker, M. (2017). Phylogenomics of *Rhodobacteraceae* reveals evolutionary adaptation to marine and non-marine habitats. *The ISME Journal*, 11(6), 1483. doi:10.1038/ismej.2016.198
- Spirig, T., Weiner, E., & Clubb, R. (2011). Sortase enzymes in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 82(5), 1044–1059. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07887.x
- Staden, R., Beal, K. F., & Bonfield, J. K. (1998). The Staden Package. *Computer Methods in Molecular Biology*, vol. 132: *Bioinformatics Methods and Protocols*. (pp. 115-130)
- Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Painter, P. R., & Wheelis, M. L. (1986). *The Microbial World* (5th ed., p. 689). Prentice-Hall.
- Stork, I., Gemann, K.-H., Burger, A., & Eichenlaub, R. (2008). A family of serine proteases of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: chpC plays a role in colonization of the host plant tomato. *Molecular Plant Pathology*, 9(5), 599–608. doi:10.1111/j.1364-3703.2008.00484.x
- Subramoni, S., Suárez-Moreno, Z., & Venturi, V. (2010). Lipases as Pathogenicity Factors of Plant Pathogens, *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 3269–3277). doi:10.1007/978-3-540-77587-4_248
- Tambong, J. (2017). Comparative genomics of *Clavibacter michiganensis* subspecies, pathogens of important agricultural crops. *PLOS ONE*, 12(3), e0172295. doi:10.1371/journal.pone.0172295
- Tancos, M., Chalupowicz, L., Barash, I., Manulis-Sasson, S., & Smart, C. (2013). Tomato Fruit and Seed Colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through External and Internal Routes. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(22), 6948–6957. doi:10.1128/AEM.02495-13
- Tancos, M., Lange, H., & Smart, C. (2015). Characterizing the Genetic Diversity of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Population in New York. *Phytopathology*, 105(2), 169–179. doi:10.1094/PHYTO-06-14-0178-R
- Thapa, S., Pattathil, S., Hahn, M., Jacques, M.-A., Gilbertson, B., & Coaker, G. (2017). Genomic analysis of *Clavibacter michiganensis* reveals insight into virulence strategies and genetic diversity of a Gram-positive bacterial pathogen. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. doi:10.1094/MPMI-06-17-0146-R

- Thrall, P. H., Hochberg, M. E., Burdon, J. J., & Bever, J. D. (2007). Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 120–6. doi:10.1016/j.tree.2006.11.007
- Thyr, B., Samuel, M. J., & Brown, P. (1975). New solanaceous host records for *Corynebacterium michiganense*. *Plant Disease Reporter*, 59(7), 595–598.
- Tseng, T.-T., Tyler, B., & Setubal, J. (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiology*, 9(Suppl 1), S2. doi:10.1186/1471-2180-9-S1-S2
- Unknown. (2016). PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *EPPO Bulletin*, 46(2), 202–225. doi:10.1111/epp.12302
- Valenzuela, M., Besoain, X., Durand, K., Cesbron, S., Fuentes, S., Claverías, F., Seeger, M. (2018). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from central Chile exhibit low genetic diversity and sequence types match strains in other parts of the world. *Plant Pathology*, 67(9), 1944–1954. doi:10.1111/ppa.12911
- Vasilenko, O., Starodumova, I., Dorofeeva, L., Tarlachkov, S., Prisyazhnaya, N., Chizhov, V., ... Evtushenko, L. (2018). Draft Genome Sequences of New Isolates and the Known Species of the Family *Microbacteriaceae* Associated with Plants. *Microbiology Resource Announcements*, 7(11), e01051–18. doi:10.1128/MRA.01051-18
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R., & Ivanova, E. (2009). Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules*, 14(7), 2535–2554. doi:10.3390/molecules14072535
- Wassermann, E., Montecchia, M., Correa, O., Damián, V., & Romero, A. (2017). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains virulence and genetic diversity. a first study in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 1–8. doi:10.1007/s10658-017-1159-z
- Wattam, A., Davis, J., Assaf, R., Boisvert, S., Brettin, T., Bun, C., ... Stevens, R. (2017). Improvements to PATRIC, the all-bacterial Bioinformatics Database and Analysis Resource Center. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D535–D542. doi:10.1093/nar/gkw1017
- Wattam, A., Foster, J., Mane, S., Beckstrom-Sternberg, S., Beckstrom-Sternberg, J., Dickerman, A., ... O'Callaghan, D. (2014). Comparative Phylogenomics and Evolution of the Brucellae Reveal a Path to Virulence. *Journal of Bacteriology*, 196(5), 920–930. doi:10.1128/JB.01091-13
- Weissenbach, J. (2016). The rise of genomics. *Comptes Rendus Biologies*, 339(7-8), 231–239. doi:10.1016/j.crv.2016.05.002
- Yadeta, K., & Thomma, B. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 4, 97. doi:10.3389/fpls.2013.00097
- Yasuhara-Bell, J., & Alvarez, A. (2014). Seed-associated subspecies of the genus *Clavibacter* are clearly distinguishable from *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt 3), 811–826. doi:10.1099/ijs.0.000022
- Yin, Y., Mao, X., Yang, J., Chen, X., Mao, F., & Xu, Y. (2012). dbCAN: a web resource for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), W445–W451. doi:10.1093/nar/gks479
- Young, C.-C., Busse, H.-J., Langer, S., Chu, J.-N., Schumann, P., Arun, A., ... Kämpfer, P. (2010). *Microbacterium agarici* sp. nov., *Microbacterium humi* sp. nov. and *Microbacterium pseudoresistens* sp. nov., isolated from the base of the mushroom *Agaricus blazei*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(4), 854–860. doi:10.1099/ijs.0.014092-0

Zaluga, J., Vaerenbergh, J., Stragier, P., Maes, M., & Vos, P. (2013). Genetic diversity of non-pathogenic *Clavibacter* strains isolated from tomato seeds. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(6), 426–435. doi:10.1016/j.syapm.2013.04.005

Zaluga, J., Stragier, P., Baeyen, S., Haegeman, A., Van Vaerenbergh, J., Maes, M., & De Vos, P. (2014). Comparative genome analysis of pathogenic and non-pathogenic *Clavibacter* strains reveals adaptations to their lifestyle. *BMC Genomics*, 15, 392. doi:10.1186/1471-2164-15-392

Zhang, H., Yohe, T., Huang, L., Entwistle, S., Wu, P., Yang, Z., ... Yin, Y. (2018). dbCAN2: a meta server for automated carbohydrate-active enzyme annotation. *Nucleic Acids Research*, gky418. doi:10.1093/nar/gky418

Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., & Xu, J.-R. (2014). Erratum to: Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. *BMC Genomics*, 15(1), 6. doi:10.1186/1471-2164-15-6

Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., ... Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2198–208.

Zushi, K. (2008). Application of Salt Stress in Production of High Quality Tomato. *Bulletin of the Society of Sea Water Science, Japan*, 62(4), 179–185. doi:10.11457/swsj1965.62.179