



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**GENÓMICA COMPARATIVA DE CEPAS DE *Clavibacter*
michiganensis AISLADAS EN MÉXICO**

Por:

Alexandra Yaquelin Guzmán López

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Alexandra Yaquelin Guzmán López la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



Dra. María Claudia Villicaña Torres
Directora de Tesis



Dra. Josefina León Félix
Integrante del comité de tesis



Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza
Integrante del comité de tesis



M. C. José Armando Carrillo Fasio
Integrante del comité de tesis

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis "Genómica Comparativa de Cepas de *Clavibacter michiganensis* Aisladas en México" es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Alexandra Yaquelin Guzmán López, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.
Coordinación de Programas Académicos



Dra. Graciela Caire Juvera
Directora General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCYT) por la beca de maestría otorgada durante todo el posgrado, y por el apoyo hacia el proyecto, a través del cual se logró realizar el proceso experimental.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD) por permitir el uso de sus instalaciones para la ejecución de la fase experimental de esta tesis en el marco del proyecto interno 768014 titulado “Aislamiento y caracterización de bacteriófagos líticos y temperados de *Clavibacter michiganensis*”.

A la Dra. María Claudia Villicaña Torres, por aceptarme en su equipo de trabajo, apoyarme y guiarme durante todo el proceso con gran dedicación y esfuerzo, siendo una excelente mentora.

A la Dra. Josefina León Félix por sus consejos y su gran entusiasmo hacia el proyecto.

Al M.C. José Armando Carrillo Fasio por siempre estar disponible para apoyar a la realización del proyecto, compartir su conocimiento y por proporcionar las cepas CMS1 y CMS2 aisladas en el laboratorio de Nematología de CIAD subsede Culiacán.

Al Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza por compartir su experiencia en el área de fitopatología, por sus enseñanzas y consejos, así como por proporcionar las semillas de tomate utilizadas en este proyecto.

Al QFB. Jesús Héctor Carrillo Yáñez por compartir consejos sobre metodologías y el uso de material y equipo de laboratorio.

A todos los investigadores que fueron mis maestros en las asignaturas cursadas durante el posgrado, por compartir su experiencia y conocimiento con el objetivo de formarme académicamente.

A la Dra. Isabel Cruz Lachica y al M.C. Isidro Márquez Zequera del laboratorio de Fitopatología por permitirme utilizar el equipo para cuantificación de ADN; así como la autoclave.

A la M.C. Rosabel Velez por su disposición para utilizar el equipo para la medición de densidad óptica.

Al la Dra. Judith Salazar Mezta por su paciencia y disposición para compartir su conocimiento en el área de fitopatología al momento de realizar el ensayo de virulencia.

A mis compañeros de generación de Maestría 2022-2024, Roxana Carrillo, Jesús Apodaca, Carlos Lazcano y Alejandro Payán por formar una linda amistad que nos ayudó a sobrellevar muchos

momentos de estrés.

A mis compañeros del equipo de trabajo del laboratorio de Biología Molecular y Genómica Funcional (BIMOGEN), Lucía Rubí, Brandon Morales, Christian Grimaldi, Richecarde Lafrance, Karina Kao, María José Martínez y Eunice Pérez por compartir su conocimiento conmigo y brindarme su ayuda siempre que lo necesité.

A los estudiantes de verano Delfín, Ary Valenzuela, Vladimir Ibañez y Lucía Martínez por su entusiasmo y apoyo en la realización de experimentos de mi proyecto.

A mis amigas Alejandra Castro, Jennifer Ruelas, Karla Aguilar, Pamela Rojo y Mariana Luna por siempre darme ánimos y escucharme.

A mis padres por apoyarme en cada decisión que he tomado para mi formación académica y estar siempre para mí.

Y finalmente a mi novio Alejandro Payán por siempre estar disponible para ayudarme, escucharme, enseñarme y aconsejarme, además de ser mi compañero en este camino compartiendo desvelos, estrés y pasión por la ciencia.

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mis padres Yaquelin López y Cesar Guzmán, que me han enseñado a trabajar por lo que quiero y me han apoyado para cumplir todas mis metas, siendo esta una de ellas, agradezco ampliamente haber aprendido el valor de la honestidad. Los amo.

Y a mi novio Alejandro Payán por ser mi compañero de vida, mi mejor amigo y mi maestro, gracias por ayudarme a hacer esto posible, te amo con todo mi corazón.

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL	3
AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA	6
RESUMEN	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
2. ANTECEDENTES	16
2.1 Importancia de la Agricultura en México.....	16
2.1.1 Factores Limitantes en la Producción Agrícola.....	27
2.2 Cancro Bacteriano	18
2.3 <i>Clavibacter michiganensis</i>	21
2.4 Estrategias para el Control de <i>C. michiganensis</i>	23
2.5 Características Genómicas Generales de <i>C. michiganensis</i>	26
2.5.1 Genes de Virulencia.....	27
2.6 Genómica Comparativa	31
2.6.1 Genómica Comparativa en <i>C. michiganensis</i>	32
3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVOS	37
4.1 Objetivo General.....	38
4.2 Objetivos Específicos	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
5.1 Estrategia Metodológica.....	39
5.2 Cepas Bacterianas y Medios de Cultivo	39
5.3 Caracterización de la Virulencia de las Cepas Bacterianas.....	40
5.3.1 Ensayo de Hipersensibilidad en Hoja de Tabaco.....	40
5.3.2 Ensayo de Virulencia	40
5.4 Caracterización Genómica.....	42
5.4.1 Extracción de Material Genético	42
5.4.2 Integridad, Cuantificación y Pureza de ADN Genómico	43
5.4.3 Secuenciación y Ensamble de Genomas.....	43
5.4.4 Anotación de Genes e Identificación de Factores de Virulencia y de Resistencia a Antibióticos	44
5.4.5 Análisis Filogenómico	47
5.4.6 Análisis de Diversidad Genética MLST	47
5.4.7 Análisis de Pangenomas	48
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50

CONTENIDO (continuación)

6.1 Ensayo de Hipersensibilidad en Hojas de Tabaco.....	50
6.2 Ensayo de Virulencia en Plantas de Tomate.	51
6.3 Ensamble y Anotación de Genomas.....	60
6.4 Análisis Filogenómico de las Cepas de <i>C. michiganensis</i>	62
6.5 Análisis de Diversidad Genética por MLST.....	64
6.6 Identificación de Genes de Virulencia y Detección de Polimorfismos.....	65
6.6.1 Plásmidos.....	65
6.6.2 Cromosoma Bacteriano.....	69
6.6.3 Isla de Patogenicidad (PAI)	73
6.6.4 Perfil General del Contenido de Genes de Virulencia.....	76
6.7 Detección de Genes de Resistencia a Antibióticos.....	79
6.8 Análisis de Pangenomas	79
7. CONCLUSIONES.....	81
8. RECOMENDACIONES.....	82
9. REFERENCIAS	83

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Diagrama esquemático de la progresión de los síntomas del cancro bacteriano en tallo.....	20
2. Ciclo de enfermedad de <i>Clavibacter michiganensis</i>	21
3. Resultados de ensayo de hipersensibilidad en hoja de tabaco.....	51
4. Evaluación de la severidad de los síntomas por cultivar/portainjertos.....	52
5. Evaluación de la severidad de los síntomas tomando como factor la cepas.....	53
6. Análisis de la escala de severidad de las cepas de <i>C. michiganensis</i> en los cultivares	54
7. Ensayo de virulencia en los cultivares.....	56
8. Análisis de la escala de severidad de las cepas de <i>C. michiganensis</i> en los portainjertos ...	57
9. Ensayo de virulencia en portainjerto	58
10. Análisis filogenómico del valor ANIm de las cepas en estudio (en negritas).....	63
11. Análisis de diversidad genética de las cepas de <i>C. michiganensis</i>	65
12. Organización estructural de los genes adyacentes al gen <i>ppaH</i> de la cepa CMS2.....	70
13. Representación esquemática de las islas de patogenicidad de las cepas CMS1 y CMS2	75
14. Análisis de pangenomas de CMS1, CMS2, CMM, CMP y NCPPB 382.....	80

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Lista de los cultivares y portainjertos de tomate utilizados para la evaluación de virulencia	40
2. Lista completa de genes de virulencia reportados para <i>C. michiganensis</i> NCPPB 382.....	45
3. Características genómicas y estadísticas de calidad del ensamble de genomas de las cepas.....	62
4. Identificación de genes de virulencia en plásmidos de las cepas en estudio.....	67
5. Polimorfismos detectados en los genes de virulencia localizados en plásmidos..	68
6. Identificación de genes en otras regiones del cromosoma.	70
7. Polimorfismos detectados en los genes de virulencia localizados en regiones del cromosoma.....	71
8. Identificación de genes de virulencia en la isla de patogenicidad.....	73
9. Polimorfismos detectados en genes localizados en la isla de patogenicidad.	74
10. Resumen del contenido de genes de virulencia de las cuatro cepas de <i>C. michiganensis</i> en estudio.	77

RESUMEN

El cancro bacteriano del tomate es una enfermedad vascular considerada como una de las más destructivas y de alta importancia siendo su agente causal *Clavibacter michiganensis*. Las principales fuentes de diseminación de dicho patógeno son la semilla contaminada y los portainjertos, causando grandes pérdidas en producción una vez que la enfermedad se ha establecido en el cultivo. Diversos estudios han observado que *C. michiganensis* presenta una alta diversidad genética en cepas aisladas de diferentes orígenes geográficos, sin embargo, en años recientes se han reportado diferentes niveles de virulencia de las cepas, lo que ha generado controversia respecto a si existe o no una correlación con el contenido de genes de virulencia, aunque en la mayoría de los estudios se han evaluado en un solo genotipo de tomate. Estudios recientes de genómica comparativa han identificado algunas diferencias y similitudes entre cepas aisladas de diferentes países como Chile, Hungría, EE. UU., entre otros; sin embargo, son pocos los estudios realizados para caracterizar cepas de *C. michiganensis* aisladas en México, y la diversidad genómica prácticamente se desconoce. El objetivo de este estudio fue identificar la diversidad genética y el perfil de genes de virulencia de cuatro cepas de *C. michiganensis* aisladas de diferentes regiones de México, además de evaluar el nivel de virulencia en cinco diferentes genotipos de tomate (tres cultivares y dos portainjertos). Interesantemente, se encontró que la virulencia de cada cepa está altamente relacionada con el genotipo utilizado, por lo que no fue posible identificar una cepa como la más virulenta de manera general. El análisis de los genomas reveló que el perfil de genes de virulencia varió entre las cepas pero no se correlacionó con la virulencia. Además, en los genes de virulencia se identificaron numerosos polimorfismos, donde algunos afectaron la secuencia de la proteína correspondiente y algunas variantes no se encontraron reportadas en las bases de datos. El análisis de pangenomas mostró que el contenido de genes únicos en cada una de las cepas fue relativamente bajo comparado con otras bacterias, y se encontraron dos serinas proteasas pertenecientes a las familias *chp* y *ppa*. Los resultados anteriores sugieren que podrían existir factores adicionales asociados a la virulencia de las cepas y la interacción planta-patógeno, así como que la evaluación funcional de los polimorfismos detectados en los genes de virulencia podría ser relevantes para determinar el rol que juegan en el proceso de patogenicidad.

Palabras claves: *Clavibacter michiganensis*, cancro bacteriano del tomate, pangenoma, genes de virulencia, variabilidad genética, polimorfismos.

ABSTRACT

Bacterial canker of tomato is a vascular disease considered one of the most destructive and highly important, its causal agent is the actinomycete *Clavibacter michiganensis*. The main sources of spreading of this pathogen are contaminated seed and rootstocks, causing great losses in production once the disease has established in the crop. Various studies have reported that *C. michiganensis* presents a high genetic diversity in strains isolated from different geographical origins, however, in recent years, different levels of strain virulence have been reported generating a controversy about whether or not there is a correlation between virulence and the virulence genes content, although most studies have evaluated virulence in a single tomato genotype. Recent comparative genomics studies have identified some differences and similarities between strains isolated from distinct countries such as Chile, Hungary, the United States, among others; nonetheless, few studies have been carried out to characterize *C. michiganensis* strains isolated from Mexico, and the genomic diversity is practically unknown. The objective of this study was to identify the genetic diversity, the virulence gene profile of four strains of *C. michiganensis* isolated from different regions of Mexico and evaluate the level of virulence in five different tomato genotypes (three varieties and two rootstocks). Interestingly, it was found that the virulence of each strain is highly related to the evaluated genotype, therefore it was not possible to identify a strain as the most virulent globally. Analysis of the genomes revealed that the virulence gene profile varied among strains but it did not show a correlation with virulence level. Furthermore, numerous polymorphisms were identified in the virulence genes, where some affected the sequence of the corresponding protein and some variants were not found reported in the databases. Pangenome analysis showed that the content of unique genes in each strain was relatively low compared to other bacteria, and two novel serine proteases belonging to the *chp* and *ppa* families were found. The above results suggest that there could be additional factors associated with the strain virulence and the plant-pathogen interaction, as well as that the functional evaluation of the polymorphisms detected in the virulence genes could be relevant to determine their role in the process of pathogenicity.

Keywords: *Clavibacter michiganensis*, tomato bacterial canker, pangenome, virulence genes, genetic variability, polymorphisms.

1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es el vegetal con mayor volumen de producción reportando 3.4 millones de toneladas cosechadas en México en el 2022 (SIAP, 2023). Sin embargo, la producción se puede ver afectada por diversos factores tanto bióticos como abióticos, entre los que se encuentran las enfermedades bacterianas, destacando el cancro bacteriano del tomate, una enfermedad vascular considerada como una de las más destructivas y de alta importancia económica, la cual es ocasionada por *Clavibacter michiganensis*, un actinomiceto Gram positivo, no móvil y aeróbico, que está catalogado como organismo de cuarentena (Malliarakis *et al.*, 2023; Thapa *et al.*, 2020). Este patógeno vascular invade y prolifera en los vasos del xilema de las plantas a través de aperturas naturales o heridas, formando estructuras parecidas a biopelículas que lo ayudan a colonizar al hospedante y a su movimiento (Tancos *et al.*, 2013). Esta enfermedad se caracteriza por una serie de síntomas que comienzan por la marchitez unilateral de las hojas, manchas costrosas en el tallo, coloraciones café en el interior del tallo y a nivel de fruto el conocido “ojo de pájaro” (Medina-Mora *et al.*, 2001; Peritore-Galve *et al.*, 2020; Sen *et al.*, 2015). Las semillas infectadas son consideradas como la principal fuente de transmisión, pues una de estas entre 10,000 es capaz de iniciar una epidemia (Tancos *et al.*, 2013). Los métodos de control existentes consisten en productos químicos formulados de compuestos de cobre como hidróxido y sulfato; bactericidas como estreptomicina y oxitetraciclina; así como combinaciones (estreptomicina/hidróxido de cobre), los cuales han resultado ineficientes para la erradicación del patógeno (Hausbeck *et al.*, 2000; de León *et al.*, 2008). Los cultivares resistentes podrían ser un método efectivo para controlar esta enfermedad, ya que reducirían el uso excesivo de químicos; sin embargo, a pesar de la importancia de este patógeno, hasta el momento no existe alguna variedad comercial con niveles significativos de resistencia (Basım y Basım, 2018; Sen *et al.*, 2015; Thapa *et al.*, 2017). En *C. michiganensis* se han identificado diversos factores de virulencia asociados al desarrollo de la enfermedad, los cuales se encuentran codificados en el cromosoma y en dos plásmidos, donde varios de los genes localizados en la isla de patogenicidad están involucrados en la supresión de las defensas basales del tomate (Chalupowicz *et al.*, 2010). A la fecha, aún no se conoce de manera precisa la función que ejercen varios de los genes de virulencia durante la infección y el desarrollo de síntomas, por lo que el estudio funcional de éstos, es crucial para

entender el mecanismo de patogenicidad (Eichenlaub y Gartemann, 2011; Nandi *et al.*, 2018). Por otro lado, diversos estudios han buscado asociar la presencia de estos genes con los diferentes niveles de virulencia del patógeno, sin embargo, existe controversia ya que se han reportado cepas con menor número de genes de virulencia o sin algunos genes considerados clave para la infección y continúan siendo virulentas; aunado a esto, en la literatura se han descrito diversos polimorfismos en los genes de virulencia pero el impacto en el proceso de patogenicidad no se conoce (Valenzuela *et al.*, 2021). En México, son pocos los estudios que se han realizado en cuanto a la genómica de *C. michiganensis*. Por tal, el objetivo de este estudio es ampliar el conocimiento de los genes de virulencia a través de estudios genómicos de cepas de *C. michiganensis* aisladas en México y evaluar su virulencia en diferentes genotipos de tomate.

2. ANTECEDENTES

2.1 Importancia de la Agricultura en México

México es uno de los principales países productores de alimentos a nivel mundial, teniendo un total de 23.4 millones de hectáreas destinadas a la agricultura, de las cuales en 2022 se cultivaron 20.6 millones de hectáreas generando empleos para un total de 5.4 millones de personas en las actividades agrícolas. La producción agrícola aporta el 91.1% del volumen total en toneladas de la producción agropecuaria, colocando al país en el lugar número 12 en producción mundial de alimentos y de cultivos agrícolas, contribuyendo tan solo en el 2022 con un valor de producción de 885 miles de millones de pesos. Actualmente, el país se sitúa en el noveno lugar a nivel mundial como exportador de productos agroalimentarios (SIAP, 2023).

Las hortalizas son de gran importancia económica en México debido a que el suelo y el clima favorecen el desarrollo de estos cultivos, principalmente en el noroeste del país (Garay *et al.*, 2014). Las principales hortalizas por volumen de producción (toneladas) cultivadas en México son el pepino (1,028,568), la cebolla (1,528,450), el chile verde (3,112,481), aportando un 6.4, 9.5 y 19.4% a la producción nacional de hortalizas, respectivamente. De éstas, el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la hortaliza con mayor volumen de producción reportando 3.4 millones de toneladas cosechadas en el 2022, participando con un 21.6% en la producción nacional de hortalizas, donde Sinaloa fue el principal productor con 638,699 toneladas (SIAP, 2023).

2.1.1 Factores Limitantes en la Producción Agrícola

Existen diversos factores que pueden ocasionar pérdidas en cuanto a la producción agrícola, los cuales se dividen en abióticos y bióticos. Los factores abióticos se refieren a los relacionados con el medio ambiente e incluyen temperaturas extremas, estrés hídrico, alta salinidad, cambios de pH, radiación, frío, entre otros (Echeverría-Molina, 2017). Entre estos se encuentra la radiación UV que es una limitante para el desarrollo del cultivo, se conoce que una reducción de 1% de radiación

tiene como resultado la pérdida de 1% de producción (Álvaro y Urrestarazu, 2011), mientras que, una baja iluminación tiene como consecuencia una polinización insuficiente provocando menores tamaños en los frutos (van de Vooren *et al.*, 1986). Las temperaturas fluctuantes afectan a la maduración del fruto (Adams, 2001), y se ha estimado que el rendimiento del cultivo disminuye un 12.6% por cada 1.2°C que se aumenten a la temperatura de 25°C. El exceso de humedad relativa aumenta el riesgo de enfermedades y además puede reducir el rendimiento final de los cultivos, afectando el promedio del peso y disminuyendo la calidad del fruto. La baja humedad relativa dificulta la fijación del polen al estigma de la flor (Álvaro y Urrestarazu, 2011; Barker, 1990). Las altas salinidades reducen el porcentaje de germinación y prolongan dicho proceso. Entretanto, a nivel de raíces, las sales alteran la absorción del agua afectando las partes aéreas de las plantas de tomate, dando como resultado menor altura, menor número de hojas, así como síntomas de clorosis y necrosis principalmente en los bordes de las hojas (Álvaro y Urrestarazu, 2011; Barker, 1990). Los factores bióticos se refieren a los causados por organismos vivos y entidades biológicas asociadas a ellos, tales como bacterias, hongos, nemátodos, insectos y malezas (Lowry *et al.*, 2019). Las plagas insectiles pueden llegar a causar severos daños económicos si no se controlan sus poblaciones; por ejemplo, *Prodiplosis longifila* es un insecto considerado uno de los principales problemas de plaga en el cultivo de tomate, limitando en Ecuador, la producción hasta 6,000 hectáreas (Chemonics, 2008; Chirinos *et al.*, 2019). Las malezas representan otro problema debido a que compiten por nutrientes, agua y luz con cultivos de importancia económica limitando su crecimiento y desarrollo, además de que pueden ser hospedantes de plagas y enfermedades al permitir que éstos completen su ciclo de vida cuando el cultivo no está en el campo (Chemonics, 2008). No obstante, las enfermedades en plantas representan una de las mayores preocupaciones en la agricultura tradicional, debido a que estos reducen tanto el rendimiento como el valor de los cultivos, siendo los principales fitopatógenos las plantas parasíticas, oomicetes, nematodos, virus, hongos y bacterias (Buttimer *et al.*, 2017; Llorens y Agustí-Brisach, 2022). Las bacterias son consideradas uno de los fitopatógenos de mayor importancia (Oliver, 2024), teniendo en cuenta la gran cantidad de enfermedades que producen y la gravedad de éstas, aunado a su rápida reproducción por fisión binaria que les permite duplicar su población en periodos muy cortos, y su capacidad para sobrevivir por períodos prolongados como saprófitos o bien en las malezas como epífitas (Sandoval, 2004). Existen más de 200 especies de bacterias fitopatógenas, de las cuales se consideran las más importantes las que pertenecen a los géneros de *Pseudomonas*, *Ralstonia*,

Agrobacterium, *Xanthomonas*, *Erwinia* y *Clavibacter*, ya que son agentes que ocasionan daños graves a cultivos de importancia económica y afectan la producción de alimentos a nivel mundial (Buttimer *et al.*, 2017; Villalpando-Aguilar *et al.*, 2023). De éstas, *C. michiganensis* es considerada como una de las más destructivas y de alta importancia debido a que en la actualidad no se cuenta con estrategias de manejo efectivo una vez que la enfermedad se encuentra en campo. Por otro lado, se conoce muy poco acerca de su mecanismo de infección, la función de muchos de los factores de virulencia, además de otros rasgos relacionados con la susceptibilidad y resistencia de los diferentes genotipos de tomate hacia el patógeno, dando lugar a pocas alternativas para su manejo y mitigación.

2.2 Cancro Bacteriano

El cancro bacteriano del tomate es una enfermedad vascular, ocasionada por la bacteria *C. michiganensis*. Reportada por primera vez a principios de 1900 por Erwin Smith en Michigan, EE. UU. (Peritore-Galve *et al.*, 2021). A partir de entonces, se ha detectado en más de 80 países de los cinco continentes (Chalupowicz *et al.*, 2017; Peritore-Galve *et al.*, 2021), donde ha ocasionado graves pérdidas económicas en la producción de esta hortaliza al reducir la calidad y la cantidad del rendimiento del tomate (Eichenlaub y Gartemann, 2011; Gartemann *et al.*, 2003; Sen *et al.*, 2015). Se estima que las pérdidas de rendimiento varían de 10 a 100%, dependiendo de factores como el método de cultivo, ubicación, susceptibilidad del cultivar y el estado fenológico del hospedante durante la etapa de infección (Sen *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018).

En México, se detectó e identificó la enfermedad en el Valle de Culiacán y se extendió de 1994 a 1996 para establecerse en las principales áreas hortícolas de exportación de los Estados de Jalisco, San Luis Potosí, Baja California Sur y Baja California Norte. Durante la temporada de cultivo de tomate de 2005 se detectó la enfermedad cerca de la región central de Baja California. Para 2009 se detectó su presencia en Sonora, principalmente en invernaderos y malla sombra, mismo año en el que se reportaron daños en 200 hectáreas en sistemas de producción protegida, representado pérdidas económicas estimadas en 40 millones de dólares (Borboa-Flores *et al.*, 2009; Ruiz-Alvarado, 2018), concordante con que el cancro bacteriano es de las principales enfermedades que

afectan la producción de tomate en invernadero (Esquivel-Cervantes *et al.*, 2022).

El cancro bacteriano se caracteriza por una variedad de síntomas que se ven influenciados por condiciones ambientales como temperatura y humedad, el estado fenológico de la planta, la susceptibilidad del cultivar y la vía en la que el patógeno ingresa al hospedante (Carlton *et al.*, 1998). En general, cuando la bacteria se encuentra dentro del hospedante, se dispersa sistémicamente, tapando y degradando los conductos del xilema, y resultando en la maceración del tejido y reducción del transporte de agua que subsecuentemente provoca el marchitamiento característico, la necrosis marginal de las hojas, canchros en tallo y lesiones en los frutos (Tancos *et al.*, 2017).

En etapas tempranas se presenta una marchitez unilateral en hojas o en la planta completa, conforme avanza la infección se forman lesiones costrosas en tallo y peciolo, a medida que invade el xilema ocasiona coloraciones cafés en el interior del tallo, teniendo como consecuencia la degradación gradual de los tejidos vasculares (Medina-Mora *et al.*, 2001; Peritore-Galve *et al.*, 2020; Sen *et al.*, 2015) (Fig. 1). A nivel de fruto se presentan las características lesiones necróticas de color café con halos blancos conocidas como “ojo de pájaro” (Medina-Mora *et al.*, 2001)

Enfocado en la vía de ingreso al hospedante, cuando se trata de una infección sistémica como el caso de semillas contaminadas o heridas en tallo o raíz (Carlton *et al.*, 1998; Tancos *et al.*, 2013), el patógeno puede invadir directamente los tejidos vasculares de las plántulas, induciendo síntomas sistémicos como la marchitez unilateral subsiguiendo a esto el marchitamiento completo de la planta, así como necrosis y cancro en tallo y peciolo (de León *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2012). En el caso de una infección localizada, infecta por aperturas naturales, como hidátodos y estomas, induce síntomas en las partes aéreas, que incluyen necrosis, marchitamiento parcial y pequeñas manchas blancas parecidas a ampollas en hojas, “ojo de pájaro” en fruto, síntomas que eventualmente conducen a síntomas sistémicos, llegando hasta la muerte de la planta si se dan las condiciones ambientales óptimas (Carlton *et al.*, 1998; Medina-Mora *et al.*, 2001; de León *et al.*, 2011; Sen *et al.*, 2013).

Enfocado en el estado fenológico de la planta, cuando la infección sistémica ocurre en la etapa de plántula, la bacteria es capaz de propagarse extensivamente provocando marchitamiento y grandes pérdidas de rendimiento; en contraste, cuando las plantas son infectadas en una etapa tardía del desarrollo, estas podrían no mostrar síntomas, o bien presentar clorosis foliar así como frutos con el síntoma de “ojo de pájaro”, cualquiera que sea el caso la calidad y cantidad del fruto se ven

afectadas (Murray *et al.*, 1996; Sharabani *et al.*, 2013).

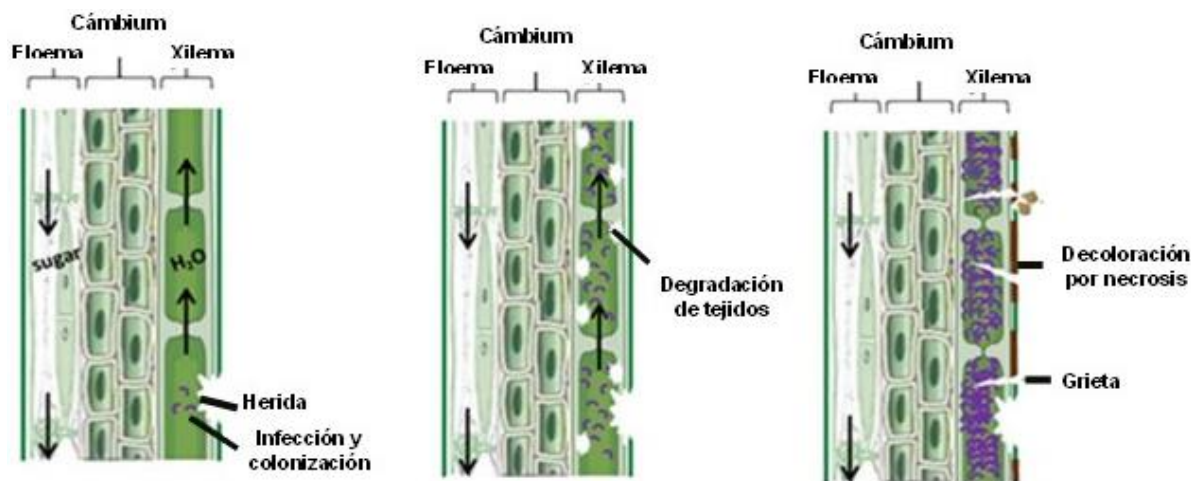


Figura 1. Diagrama esquemático de la progresión de los síntomas del cancro bacteriano en tallo. Editado de Nandi *et al.* (2018).

Las semillas contaminadas se consideran como la principal fuente de diseminación a larga distancia, así como la principal fuente de inóculo que conduce a brotes de esta enfermedad, ya que una sola semilla infectada entre 10,000 es capaz de iniciar una epidemia (Tancos *et al.*, 2013). Otro medio de diseminación es por medio de los trasplantes ya que pequeñas poblaciones de la bacteria se pueden incrementar rápidamente durante su producción comercial a través de salpicaduras de agua y/o equipo (Chang, 1991). El hacer los cortes de vástago y portainjerto, al momento de generar plantas injertadas significa otra ruta para introducir el patógeno a la planta (Xu *et al.*, 2010; de León *et al.*, 2011). El suelo contaminado en conjunto con los restos de plantas también representan fuentes importantes de inóculo y se ha reportado que *C. michiganensis* puede sobrevivir en restos de plantas en condiciones de campo durante más de 10 meses y puede contribuir a la diseminación por suelo por más de cuatro años (Chang *et al.*, 1991; Fatmi y Schaad, 2002; Tancos *et al.*, 2013). Sin embargo, *C. michiganensis* es un saprofito pobre por lo que, sin restos de planta, puede sobrevivir solamente durante 3 a 4 semanas (Basu, 1970; Gleason, 1991). De igual manera, el patógeno se puede diseminar a través de endófitos asociados con plantas no hospedantes (Thapa *et al.*, 2017). Así mismo, el patógeno se puede propagar por salpicaduras o goteo de agua o herramientas contaminadas (Chang, 1991; Gitaitis, 1991; Ricker, 1993; Carlton *et al.*, 1998; Xu *et*

al., 2010). Dentro del invernadero, el patógeno se puede diseminar mecánicamente por tijeras de poda y por las manos de los trabajadores (Kawaguchi *et al.*, 2010; Sharabani, Borenstein, *et al.*, 2013). El ciclo que sigue la enfermedad se muestra en la Figura 2.

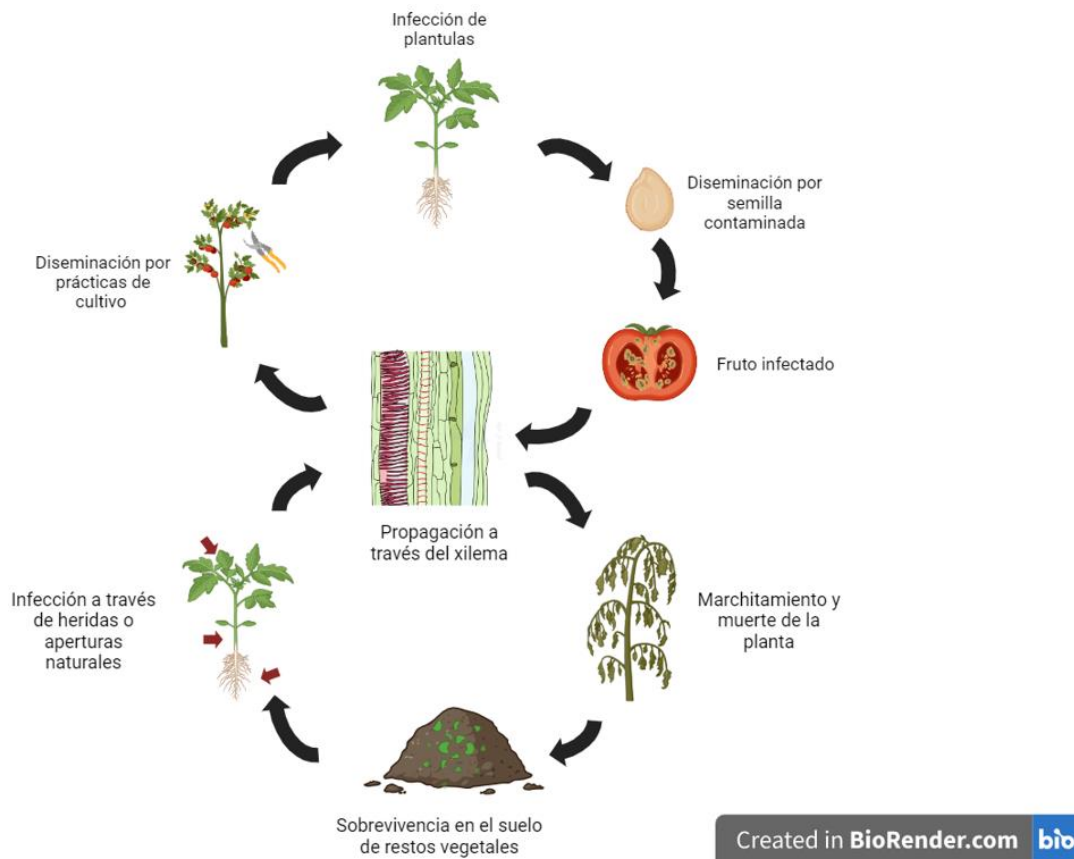


Figura 2. Ciclo de *Clavibacter michiganensis* en tomate. Adaptado de Eichenlaub *et al.*, (2006). Creado en BioRender.com

2.3 *Clavibacter michiganensis*

Clavibacter michiganensis es un patógeno regulado, enlistado en las listas A1 y A2 de la Organización Europea y Mediterránea de Protección Vegetal (conocida por su acrónimo en inglés EPPO: European and Mediterranean Plant Protection Organization), lo que significa que es un organismo de cuarentena (Malliarakis *et al.*, 2023; Thapa *et al.*, 2017).

Originalmente, *C. michiganensis* se describió como *Bacterium michiganense*, aunque posteriormente se denominó *Aplanobacter michiganense*. Subsecuentemente, se reclasificó como *Corynebacterium michiganense* basado en su forma celular corineforme irregular, hasta que, en 1984, Davis *et al.*, (1984) propusieron el género *Clavibacter* para agrupar a las bacterias basado en su composición única de pared celular, que contiene 2,4-ácido diaminobutírico en la capa de peptidoglicano. Este género estaba conformado por seis subespecies donde se encontraba este patógeno nombrado *C. michiganensis*, subsp. *michiganensis*. Actualmente, el género *Clavibacter* se reorganizó en nueve especies basados en estudios de genoma completo: *C. michiganensis* (cancro bacteriano del tomate), *C. nebraskensis* (marchitez y tizón del maíz) (Osdaghi *et al.*, 2023), *C. capsici* (cancro bacteriano en chile) (Oh *et al.*, 2016), *C. sepedonicus* (podredumbre anular de la papa) (Eichenlaub y Gartemann, 2011), *C. tessellarius* (mosaico y mancha bacteriana en trigo) (Eichenlaub y Gartemann, 2011), *C. insidiosus* (marchitez de la alfalfa) (Gudmestad *et al.*, 2009), *C. zhangzhongyongii* (mancha marrón en cebada) (Tian *et al.*, 2021), *C. californiensis* y *C. phaseoli* (amarillamiento de hojas en frijol) (González y Trapiello, 2014). Recientemente, *C. californiensis* y *C. phaseoli* se unieron en un solo taxon por su alta similitud basado en análisis de genoma completo, cálculo de ANIm, hibridación digital ADN-ADN, análisis de secuencias multilocus en genes constitutivos o “housekeeping” y *C. phaseoli* fue ascendida a especie (Arizala *et al.*, 2022). *Clavibacter michiganensis* es un actinomiceto Gram positivo, no móvil, aeróbico, no productor de esporas, perteneciente a la familia *Microbacteriaceae* (Li *et al.*, 2018; Nandi *et al.*, 2018; Yasuhara-Bell y Alvarez, 2015). Generalmente crece a temperaturas entre 20 y 30°C, pudiendo sobrevivir hasta 50°C y crece óptimamente a 25°C. Esta bacteria puede crecer en medio artificial, pero su crecimiento es lento tomando de 3 a 7 días para que sus colonias sean visibles en el medio. El pH óptimo de crecimiento es entre 7 y 8, aunque se ha reportado que *Clavibacter* puede crecer en el xilema de la planta incluso a un pH de 5 (Sen *et al.*, 2015).

Clavibacter michiganensis es un patógeno vascular que invade y prolifera en los vasos del xilema a través de aperturas naturales o heridas, formando estructuras parecidas a biopelículas que lo ayudan a colonizar al hospedante y a su movimiento a lo largo de la planta. Puede sobrevivir en estacas de enrejado, bancas de invernadero y herramientas durante años, debido a su habilidad para tolerar la desecación y bajas temperaturas (Tancos *et al.*, 2013). Genéticamente, se sabe que varios factores de virulencia se encuentran en dos plásmidos y en una isla de patogenicidad ubicada en el cromosoma denominada *chp/tomA*, mientras que otros se encuentran dispersos en el genoma

(Chalupowicz *et al.*, 2010; Gartemann *et al.*, 2008). Además de las cepas patógenas, se han identificado cepas de *C. michiganensis* que son capaces de colonizar el tejido vascular del tomate sin inducir síntomas considerándose como endófitas, ya que pueden aislarse de las superficies de tejido vegetal con ausencia de síntomas visibles de enfermedad (Eichenlaub y Gartemann, 2011; Załuga *et al.*, 2014; Thapa *et al.*, 2017).

2.4 Estrategias para el Control de *C. michiganensis*

Las estrategias de manejo de las enfermedades se pueden agrupar en cuatro categorías: exclusión, erradicación, prevención y control, teniendo en esta última categoría el control químico, biológico y genético. La manera en que se aplica la exclusión es a través de medidas como el uso de materiales de propagación limpios (libres de patógenos), plantas, agua y personal (Sen *et al.*, 2015). Debido a que la diseminación de esta enfermedad se realiza a través de semillas, trasplantes, suelo, equipo y herramientas contaminados, se ha propuesto principalmente un tipo de control preventivo al momento de las prácticas de cultivo. Por ejemplo, el hacer muestreos de las semillas es una herramienta esencial para el manejo de este patógeno, así como a través de certificaciones fitosanitarias y programas de cuarentena. Sin embargo, no es práctico muestrear todas las semillas, por lo que no existe un protocolo que nos asegure completamente un lote libre de patógenos (de León *et al.*, 2011). Por esta razón, también se ha optado por aplicar tratamientos a las semillas aplicando nitrato acidificado o ácido clorhídrico al 1%, lo que ha demostrado que logra eliminar a *C. michiganensis* efectivamente, tanto en semillas infectadas naturalmente como en las inoculadas; por otro lado, se ha llevado a cabo la termoterapia para la desinfección, donde se encontró que temperaturas de 48° y 52°C fueron efectivas para las semillas de algunos cultivares, mientras que temperaturas más altas fueron perjudiciales para la germinación de las semillas (Divsalar, 2014). Después de un brote de enfermedad en campo las medidas críticas a seguir para la prevención de un nuevo brote son la limpieza minuciosa de todas las herramientas y equipo utilizado, arar profundamente los restos de material infectado para alentar una descomposición rápida y realizar la rotación de cultivos por lo menos de 3 años dependiendo del ambiente y la región (Chang *et al.*, 1991; Vega y Romero, 2016).

Dentro del control químico se ha implementado el uso de compuestos de cobre como hidróxido y sulfato, bactericidas como estreptomycin y oxitetraciclina, así como sus combinaciones (estreptomycin/hidróxido de cobre), los cuales han resultado ineficientes para la erradicación del patógeno e incluso el uso de compuestos de cobre puede resultar en efectos fitotóxicos (Hausbeck *et al.*, 2000; de León *et al.*, 2008; Sen *et al.*, 2015). Otro estudio evaluó diferentes tratamientos con combinaciones de sustancias antibacteriales, formulados comerciales y mezclas de oligoelementos con cobre y zinc, y demostraron que el sulfato de cobre o la combinación de sulfato de cobre combinado con 8-hidroxi-quinolona resultaron ser los tratamientos más efectivos al reducir los síntomas en plantas inoculadas con la bacteria por aspersión (de León *et al.*, 2008). También se ha mencionado el uso de aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), orégano (*Origanum vulgare*), *Dictamnus* y mejorana (*Origanum majorana*), los cuales fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano *in vitro*; así mismo, los extractos y los metabolitos puros del orégano como el carvacrol demostraron una actividad antimicrobiana potente contra *C. michiganensis* y la reducción en el desarrollo de síntomas sin afectar la germinación o crecimiento en plántulas de tomate (Daferera *et al.*, 2003; Kotan *et al.*, 2014).

El control biológico se basa principalmente en la aplicación de microorganismos antagonistas, entre los cuales se han reportado bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, así como los hongos *Trichoderma harzianum* y *Rhodosporidium diobovatum* dando lugar a la reducción del desarrollo del cancro bacteriano en condiciones de invernadero (Utkhede y Koch, 2004). El control biológico de fitopatógenos basado en bacteriófagos se ha considerado también como una alternativa debido a su alta especificidad, facilidad de preparación y bajo costo de producción (Loc-Carrillo y Abedon, 2011). No obstante, son pocos los estudios que se han realizado para el control de *Clavibacter* spp. Echandi y Sun (1973) aislaron y caracterizaron biológicamente el bacteriófago CMP1 aislado de tallo de tomate infectado. Wittmann *et al.* (2011) continuaron con la caracterización genómica de CMP1 donde encontraron en su genoma un gen que codificó para una endolisina con actividad de peptidasa, la cual lisa específicamente a la bacteria de interés. Cinco años más tarde, Wittmann *et al.* (2016) generaron plantas de tomate transgénicas que sobreexpresaron la endolisina previamente reportada, las cuales fueron completamente resistentes a *C. michiganensis* (de León *et al.*, 2011). Bekircan Eski y Darcan (2023) lograron aislar 22 bacteriófagos específicos de *C. michiganensis*, de los cuales posteriormente caracterizaron 10 fagos por su amplio rango de hospedantes mostrando que algunos de ellos presentaron alta tolerancia a

la temperatura y diferentes pH, donde el fago 33 resultó ser el más efectivo en la curva de crecimiento, utilizando la cepa DB3. Por otro lado, se ha desarrollado un producto comercial AgriPhage (OmniLytics Inc, 2018), que contiene en su formulación 0.0005% de un bacteriófago activo contra *C. michiganensis*, el cual sus formuladores recomiendan utilizar como un control preventivo o curativo al inicio de los primeros síntomas. A la fecha han sido pocos los bacteriófagos aislados y secuenciados de *Clavibacter* spp., de tal manera que en bases de datos solo se cuenta con tres genomas completos de los fagos CMP1 (Genbank GQ241246), phage 33 (OR548257) y CN1A (GenBank KF669650), y secuencias parciales del fago CN77 (GenBank GU097882 y HQ123587–HQ123592). Sin embargo, se ha observado que los resultados de la aplicación de bacteriófagos para el control de enfermedades en plantas tienen resultados variables y tampoco han logrado controlar efectivamente la enfermedad del cancro bacteriano. Además, el uso de fagos enfrenta diversos retos tales como la generación de resistencia por parte de las bacterias, y la posibilidad que tienen los fagos de representar vectores para elementos genéticos móviles, que pueden incluir genes de resistencia a antibióticos (Svircev *et al.*, 2018).

Otro método para controlar *Clavibacter* consiste en la activación química del sistema de defensa de las plantas que pueden resultar en barreras físicas o químicas contra la invasión del patógeno. Entre estos activadores de la resistencia de la planta se encuentra el ácido salicílico, el ácido jasmónico (Baysal *et al.*, 2005), sales de potasio, el ácido 2,6-dicloroisonicotínico, el ácido DL- β -aminobutírico, el acibenzolar-S-metilo, y otras moléculas volátiles como el óxido nítrico y el etileno (Baysal *et al.*, 2003).

Con respecto a los métodos genéticos, se conocen cultivares resistentes a la enfermedad de cancro bacteriano como H1305, H1307, H1310, H1311, H1418, H1421, H1422 y H1428 de la compañía de Heinz. Sin embargo, se encuentran protegidos por patentes (US2017105376-A1, US2017035014-A1, US2015327457-A1 y US9861046-B2) (Wang *et al.*, 2018). Varias líneas de tomate silvestre se han identificado como las más resistentes entre las que se encuentran *S. pimpinellifolium*, *S. peruvianum*, *S. habrochaites*, y *S. parviflorum*, o cultivares derivados de éstas; sin embargo, puede observarse que la bacteria mantiene su capacidad de infectarlas. Incluso evaluaciones realizadas en *S. habrochaites* (LA2128) y *S. arcanum* (LA2157 y LA2172) por Peritore-Galve *et al.* (2020), concluyeron que *C. michiganensis* puede colonizar los tejidos vasculares y del fruto de estas especies silvestres, pero presentan una reducción en la propagación sistémica. Por otro lado, se han realizado intentos para la generación de cultivares resistentes,

introduciendo rasgos de resistencia a cultivares de tomate a través de cruces con materiales resistentes; desafortunadamente estos intentos han resultado en la pérdida de otras características deseables para la comercialización del fruto; este es el caso de las cruces de la línea susceptible de tomate 98-1 con *S. nigrum*, donde se obtuvo que las plantas de progenie resultaron ser moderadamente resistentes, sin embargo, la introducción de este rasgo generó plantas y frutos más pequeños afectando la calidad del cultivo (Li *et al.*, 2012). Otro grupo de investigación encontró resultados similares haciendo cruzamientos con *S. habrochaites* LA407, que además de producir frutos pequeños, presentaron partenocarpia, es decir, frutos sin semillas (Yang *et al.*, 2007). Esto indica que los loci de resistencia en tomates silvestres están fuertemente relacionados a factores que afectan negativamente rasgos asociados con la productividad en la agricultura (Wang *et al.*, 2022). Los cultivares resistentes podrían ser un método efectivo para controlar esta enfermedad, ya que reducirían el uso excesivo de químicos; sin embargo, a pesar de la importancia de este patógeno, hasta el momento no existe alguna variedad comercial con niveles significativos de resistencia (Basım y Basım, 2018; Sen *et al.*, 2015; Thapa *et al.*, 2017).

Aunque se han encontrado niveles significativos de control por parte de los métodos químicos y biológicos, estos no siempre resultan económicamente viables y no se utilizan de manera cotidiana (Sen *et al.*, 2015). Además, existen diversas desventajas relacionadas al uso de químicos tales como el aumento de costos de producción, probabilidad de desarrollo de resistencia y un impacto ambiental negativo (Esquivel-Cervantes *et al.*, 2022). Una vez que la enfermedad se encuentra en el campo, debido a que las opciones de manejo son limitadas, la única opción es descartar las plantas sintomáticas como una manera de erradicar el problema (de León *et al.*, 2011). Finalmente, ninguno de los métodos de control de esta enfermedad mencionados, incluyendo el uso de plántulas certificadas como libres de patógenos se ha encontrado completamente efectivo (Basım y Basım, 2018).

2.5 Características Genómicas Generales de *C. michiganensis*

Clavibacter michiganensis pertenece al filo Actinobacteria, el cual se caracteriza por tener genomas con altos contenidos de guanina-citosina (%GC) (Nandi *et al.*, 2018; Peritore-Galve *et*

al., 2021). Los genomas secuenciados de diversas cepas de *C. michiganensis* incluyen un cromosoma con tamaños que van de 3.3 a 3.6 Mb. Presenta dos plásmidos, donde el plásmido pCM1 presenta un rango de tamaño de 31 a 59 kb, mientras que el plásmido pCM2 presenta un rango entre 64 a 109 kb, siendo este último el menos conservado tanto en tamaño como contenido genético entre las distintas cepas patógenas. Por otro lado, ninguno de los dos plásmidos se encuentra presente en cepas endófitas (Nandi *et al.*, 2018; Thapa *et al.*, 2017).

A lo largo de los años, el genoma de referencia utilizado para investigación genética ha sido el de la cepa NCPPB 382 (Número de acceso: ASM6348v1), mismo que cuenta con un cromosoma circular (3.2 Mb; 72.6% GC), así como dos plásmidos circulares, pCM1 (27.4 kb; 66.5% GC) y pCM2 (70 kb; 67.6% GC). En 2019, el genoma de referencia se ha actualizó en la base de datos de NCBI, siendo la cepa UF1 (Número de acceso: ASM973965v), que cuenta con un cromosoma circular de (3.2 Mb; 72.5% GC), y dos plásmidos circulares: pCM1-UF1 (20.5 kb; 68% GC) y pCM2-UF1 (73.1 kb; 67% GC). Actualmente, se encuentran disponibles 296 genomas de *C. michiganensis* en la base de datos de NCBI, de los cuales 19 son genomas completos, siendo el resto de ellos genoma a nivel de borrador reportados como contig o scaffold (Acceso el 09 de junio de 2024)

2.5.1 Genes de Virulencia

La habilidad del patógeno para inducir la enfermedad depende de su capacidad de colonizar y de los factores de virulencia. Existe evidencia de que la ausencia de cualquiera de los plásmidos característicos presentes en *C. michiganensis* disminuye la virulencia, a diferencia de las cepas libres de plásmidos, que aun cuando son capaces de colonizar el tejido de tomate, no son capaces de inducir síntomas (Thapa *et al.*, 2017).

En el proceso de elucidación del mecanismo molecular de la patogenicidad de *C. michiganensis*, se encontró una amplia región de 129 kb con un bajo contenido de GC en el cromosoma de la cepa NCPPB 382, la cual se divide en dos regiones: *chp*, que contiene varias serinas proteasas; y *tomA*, que contiene genes que codifican para proteínas involucradas en la absorción de azúcares y el gen *tomA* que codifica para una tomatinasa. Esta región se reconoció como isla de patogenicidad (PAI,

por sus siglas en inglés), debido a que se encontró que una cepa derivada de NCPPB 382 que carecía de la mayoría de esta región no era virulenta (Kleitman *et al.*, 2008). Además, se presentó en todas las cepas patógenas de *C. michiganensis* secuenciadas y se encontraba ausente en cepas endófitas (Thapa *et al.*, 2017).

Los primeros genes de virulencia clave detectados son *celA* y *pat-1*, codificados en los plásmidos pCM1 y pCM2, respectivamente (Dreier *et al.*, 1997; Jahr *et al.*, 2000). El gen *celA* codifica para una proteína quimérica que contiene dominios de celulasa, unión a carbohidratos y expansina, misma que resulta esencial para el desarrollo de los síntomas de marchitez (Gartemann *et al.*, 2008; Jahr *et al.*, 2000). Esto se dilucidó en la cepa Cmm100 (carente de ambos plásmidos), la cual es avirulenta, y en la cepa CMM101 (solo contiene el plásmido pCM1) que ocasionó la marchitez en plantas de tomate pero con un retraso de 6 días; además, se demostró que la complementación con el plásmido pDM302:B1 (contiene *celA*) logró reestablecer la capacidad de producir marchitez y actividad celulasa *celA* en cepas no virulentas y libres de plásmidos (Jahr *et al.*, 2000).

El gen *pat-1* codifica una serina proteasa de la subfamilia de quimotripsina S1A y se determinó su función realizando deleciones en un motivo de secuencia repetitiva del gen, lo que se reflejó en la demora de la inducción de síntomas de marchitez (Dreier *et al.*, 1997). Así mismo, a través de análisis de secuenciación de genoma completo se han identificado nueve homólogos de *pat-1*, de los cuales los genes *phpA* y *phpB* se localizan en pCM2, y siete genes *chpA-G* en la isla de patogenicidad *chp/tomA* (Chalupowicz *et al.*, 2010), formando la familia *chp*. De ellos, solo se ha verificado la función de *chpC* en la cepa NCPPB 382, donde contribuye en el desarrollo de síntomas como la colonización y el marchitamiento, así como su participación en la supresión de la defensa del hospedante (Chalupowicz *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2022). Por otro lado, basándose en estudios realizados en otros cultivos, se puede inferir que la proteína *chpG* está involucrada en la interacción planta-patógeno, pues se ha observado que puede desencadenar la respuesta de hipersensibilidad en hospedante como el chile (*Capsicum annuum*), resultando ser un factor clave para la virulencia de cepas de *C. capsici* (Hwang *et al.*, 2020). El gen *chpA* localizado en el cromosoma se considera un pseudogén, pues su secuencia muestra codones de terminación internos, así como dos cambios de marco de lectura al ser comparada con la del gen *pat-1*, generando una proteína trunca de 97 aminoácidos en lugar de 280. En cambio, para los genes *phpA* y *phpB* se ha sugerido que no contribuyen a la patogenicidad, dado que al introducir y sobreexpresar estos genes en un plásmido en la cepa libre de plásmidos CMM100, no se observaron

síntomas en plantas de tomate con esta cepa incluso cuatro semanas después de la inoculación (Burger *et al.*, 2005).

Otros genes de virulencia importantes pertenecen a la familia Ppa, donde se agrupan serinas proteasas similares a la quimotripsina, a la cual pertenecen 11 genes: seis en la isla de patogenicidad (*ppaA-ppaE*, incluyendo *ppaB1* y *ppaB2*), cuatro genes en un par de regiones cromosómicas (*ppaF-ppaI*), y uno en el plásmido pCM1 (*ppaJ*) (Gartemann *et al.*, 2008). Los genes localizados fuera de la isla de patogenicidad (*ppaF*, *ppaG*, *ppaH* y *ppaI*) son conservados entre cepas patógenas y no patógenas, sin embargo, los que se encuentran en la isla de patogenicidad (*ppaA-ppaE*) son más conservados. La mayoría de las cepas patógenas y no patógenas carecen del gen *ppaJ* (Méndez *et al.*, 2020). Por otro lado, se ha demostrado la expresión de los genes *ppaB1*, *ppaB2*, *ppaC*, *ppaD*, *ppaH* y *ppaI* en plantas de tomate infectadas mediante análisis proteómico, sugiriéndose así que podrían tener un rol clave en la virulencia (Savido *et al.*, 2012).

El tercer grupo de genes es la familia de las subtilasas proteasas, conformada por tres genes: *sbtA*, localizada en la región *chp* de la isla de patogenicidad; y *sbtB* y *sbtC*, que se encuentran en otras regiones del cromosoma (Gartemann *et al.*, 2008). La mayoría de estas son proteasas secretadas en etapas tempranas de la infección y se requieren para el movimiento efectivo del patógeno y la formación de agregados bacterianos en el xilema del tomate (Chalupowicz *et al.*, 2012; Savido *et al.*, 2012). Cada uno de estos genes se pueden detectar a nivel de transcrito o de proteína en plantas infectadas de manera foliar o sistémica. Mutaciones en estos genes resultan en bajos niveles de formación de ampollas en hojas durante la infección foliar; sin embargo, las mutaciones en el gen *sbtA* reducen significativamente la incidencia de síntomas en infecciones foliares y sistémicas (Chalupowicz *et al.*, 2017).

Además de las proteasas, *C. michiganensis* también es capaz de secretar enzimas hidrolíticas activas en carbohidratos (CAZymes, por sus siglas en inglés), las cuales están involucradas en el metabolismo y la degradación de los componentes de la pared celular de las plantas (Cantarel *et al.*, 2009). Entre estas se encuentran celulasas, en pCM1 se encuentra *celA* descrita previamente; así como dos endoglucanasas codificadas por los genes *endX* y *endY*, donde las mutaciones en estas endoglucanasas disminuyen la incidencia de ampollas foliares, a diferencia de los síntomas de infección sistémica que no son alterados, por lo que se sospecha su participación en la degradación de celulosa durante la infección foliar (Chalupowicz *et al.*, 2017; Nandi *et al.*, 2018). Dentro de la misma categoría, se encuentran las xilanasas tipo β -1-4-xilanasas codificadas por los genes *xysA* y

xysB, las cuales se encuentran localizados en el cromosoma y se ha identificado su inducción en etapas tempranas de infección (Chalupowicz *et al.*, 2010; Nandi *et al.*, 2018). El gen *pgaA* localizado en el cromosoma codifica una poligalacturonasa, la cual se ha demostrado que reduce la incidencia de ampollas foliares (Chalupowicz *et al.*, 2017). Por último, los genes *pelA1* y *pelA2* localizados en la isla de patogenicidad codifican enzimas pectato liasas, las cuales presentan una identidad de 90-92% entre ellos, y se ha demostrado que en medio mínimo M9, los niveles de expresión de *pelA1* son más altos que los de *pelA*; además al ser evaluado en plantas, la delección en *pelA1* resultó en la reducción de síntomas de marchitez, a diferencia de la delección en *pelA2* que no presentó cambios, por lo que se ha destacado que *pelA1* podría ser relevante para aumentar la virulencia en tomate (Nandi *et al.*, 2018; Thapa *et al.*, 2017).

Otras proteínas que juegan un rol importante en la patogénesis son una perforina y una sortasa codificadas por el gen *perF* y *srtA*, respectivamente, ambos localizados en el cromosoma. Se encontró que estos genes podrían ser esenciales para la formación de ampollas, mediante la translocación de efectores proteicos hacia la célula hospedante durante la penetración de las hojas y en un menor grado cuando la penetración es a través de heridas o semillas. Por otro lado, la mutación del gen *srtA* redujo significativamente la formación de ampollas, sugiriéndose que está involucrada en la fijación de la bacteria a la superficie de la hoja, promoviendo de esta manera una proliferación exitosa y la penetración de los tejidos mesófilos (Chalupowicz *et al.*, 2017).

En el caso de reguladores transcripcionales, se ha descrito que los genes *vatr1*, miembro de la familia TetR de represores transcripcionales, y *vatr2*, miembro de la familia GntR de reguladores, se localizan en el cromosoma y pueden funcionar como represores o activadores. El análisis de mutantes reveló que *vatr1* reguló positivamente 34 genes cuando *vatr2* reguló 36 genes, teniendo en común 25 genes de estos reportados. Entre los genes regulados a la baja en respuesta a estas mutaciones en *vatr1* son *pat-1*, *sbtC* y *celA*, mientras que, para las mutaciones en *vatr2* se encuentran *pat-1* y *phpA*. De estos, *pat-1*, *phpA* y *celA* se localizan en plásmidos, destacando así la interdependencia entre genes codificados en el cromosoma y ambos plásmidos para la expresión de la virulencia, por lo que estos podrían compartir elementos regulatorios en *cis* que son afectados por los mismos elementos en *trans* y podrían cooperar en vías de regulación (Savidor *et al.*, 2014). Diversos estudios sugieren que los genes localizados en la isla de patogenicidad están involucrados en la supresión de las defensas basales del tomate (Chalupowicz *et al.*, 2010). Este es el caso del gen *tomA* que se localiza en la PAI y codifica una tomatinasa que se encarga de degradar la α -tomatina producida por el tomate (Kaup *et al.*, 2005), la cual es un metabolito secundario

producido como un componente basal de defensa en respuesta a infecciones por hongos (Roldán-Arjona *et al.*, 1999) y bacterias (Arwiyanto *et al.*, 1994). Sin embargo, el papel de la tomatinasa no es muy claro ya que mutantes en este gen no provocaron cambios en la virulencia (Kaup *et al.*, 2005), y se ha sugerido que participa en la supresión de los sistemas de defensa de la planta. A pesar de que se han identificado diversos factores asociados a la virulencia de *C. michiganensis*, aún no se conoce la función precisa que cumplen algunos de estos genes, por lo que el estudio y la identificación de nuevos genes es crucial para entender el mecanismo de patogenicidad, así como que podría servir como base para la generación de bactericidas específicos (Nandi *et al.*, 2018).

2.6 Genómica Comparativa

La genómica comparativa se refiere a la comparación directa del genoma completo de un organismo contra otro, con el objetivo de tener un mayor entendimiento de cómo han evolucionado las especies. Estos análisis nos permiten comparar la cantidad y el contenido de los genes, así como su ubicación, la cantidad y tamaño de las regiones no codificantes (exones), la cantidad de ADN no codificante en los genomas y las regiones conservadas; es decir, además de identificar la relación evolutiva nos brinda información sobre las similitudes y diferencias entre especies (Sivashankari y Shanmughavel, 2007). En este sentido, este campo de investigación se centra en analizar similitudes y diferencias entre los genomas de diferentes organismos (Ávila *et al.*, 2012). En el contexto de la fitopatología ha permitido comprender la estructura y la función de los genes (García-Romero, 2019). Específicamente para bacterias ha permitido comprender sus mecanismos de patogenicidad, a través de análisis genómicos y transcriptómicos que permiten identificar genes relacionados con la virulencia y el proceso de infección (Cubero *et al.*, 2022); por otro lado, también permite identificar dianas de detección y propicia el desarrollo de posibles estrategias de manejo efectivo para los cultivos (Cubero *et al.*, 2022; García-Romero, 2019).

Estos análisis nos permiten comparar la cantidad y el contenido de los genes, así como su ubicación, la cantidad y tamaño de las regiones no codificantes (exones), la cantidad de ADN no codificante en los genomas y las regiones conservadas; es decir, además de identificar la relación evolutiva nos brinda información sobre las similitudes y diferencias entre especies. Para el análisis de esta información se requiere del uso de la bioinformática, donde se utilizan herramientas de software

como línea de comandos o programas gráficos de mayor complejidad (Goujon *et al.*, 2010). Existe una gran diversidad de recursos informáticos en internet disponibles de manera gratuita, tanto en línea como para los sistemas operativos Windows, Mac y Linux (Nielsen *et al.*, 2010). Además de esto se hace uso de la biología computacional, en donde las herramientas más utilizadas son BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y ClustalW, que son herramientas que nos permiten determinar similitudes entre secuencias de nucleótidos o proteínas, en el caso del primero permite hacer comparaciones con secuencias almacenadas en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) (Ávila *et al.*, 2012).

Numerosos estudios realizados con el análisis de cepas de *C. michiganensis* aisladas de diversos orígenes geográficos han revelado que existe una considerable diversidad genética, particularmente en la composición y cantidad de los plásmidos, así como la presencia/ausencia de genes (Thapa *et al.*, 2017). Los aislados virulentos caracterizados han mostrado tener una gran variabilidad en cuanto al contenido de plásmidos, que varían de cero a tres, cuya composición genética aún está por estudiarse (Peritore-Galve *et al.*, 2021). Sin embargo, al realizarse diversos estudios de diversidad genética, se han descrito cepas patógenas con diferentes repertorios de genes capaces de generar síntomas, por lo que se ha sugerido que no existe una correlación entre los genes de virulencia conocidos y la habilidad de la bacteria para infectar, debido a que distintos estudios alrededor del mundo han indicado que existen cepas altamente virulentas que no contienen algunos de los genes reportados, por el contrario otras cepas menos virulentas contienen todos estos genes (Malliarakis *et al.*, 2023).

Dada la alta variabilidad genética reportada para *C. michiganensis*, resulta de gran importancia que se evalúe en este contexto la identificación y estudio de los factores de virulencia, para contribuir a un mejor entendimiento de los mecanismos involucrados en el proceso de infección.

2.6.1 Genómica Comparativa en *C. michiganensis*

Varios estudios han utilizado variantes de las cepas de *C. michiganensis* que carecen de algunos de estos elementos. Chalupowicz *et al.* (2010) evaluaron cuatro derivados de las cepas Cmm382 y Cmm27 carecientes de la isla de patogenicidad *chp/tomA*, Cmm101 que carecía del pCM2, Cmm102 carente de pCM1, y Cmm100 carente de ambos plásmidos. En este estudio se encontró

que los genes *celA* y *pat-1* se indujeron significativamente en la cepa Cmm382 entre las 12 y 72 h, a diferencia de los genes *chpC* y *ppaA* se indujeron hasta las 96 h después de la infección. Al evaluar los niveles de expresión de varios genes (*celA*, *pat-1*, *chpC*, *ppaA*, *celB*, *pelA1*, *xysA* y *xysB*) se observó una interdependencia de la expresión de los genes localizados en el cromosoma y en plásmidos, pues la expresión de *celA* y *pat-1* mostró una reducción en ausencia de la isla de patogenicidad, mismo comportamiento en la expresión de *chpC* y *ppaA* en ausencia de plásmidos. Posteriormente, otro estudio analizó la cepa Cmm27 (carente de la isla de patogenicidad) y la cepa Cmm100 (carente de los dos plásmidos). Las cepas Cmm382 y Cmm100 ocasionaron lesiones parecidas a ampollas en las hojas, en tanto que, la cepa Cmm27 no ocasionó este síntoma, indicando que los genes localizados en el plásmido no participan en el desarrollo de este tipo de síntomas. Después de 30 dpi, la cepa silvestre Cmm382 causó la muerte de las plantas infectadas (Chalupowicz *et al.*, 2017).

Del mismo modo, el trabajo de Thapa *et al.*, (2017) construyó y evaluó derivados de la cepa CASJ002, uno carente de ambos plásmidos (CASJ002 Δ p1 Δ 2) que fue capaz de colonizar plantas con títulos similares a la cepa parental sin provocar síntomas de cancro, y otra cepa careciente de pCM2 (CASJ002 Δ p2), la cual exhibió una marchitez reducida y una patogenicidad débil; y de la cepa CASJ001, un derivado carente de pCM1 (CASJ001 Δ p1) que al igual que CASJ002 Δ p1 Δ 2 no indujo síntomas de cancro, indicando el rol esencial de pCM1 para la patogenicidad. Cabe destacar que dos cepas utilizadas en el mismo estudio (CASJ001 y CASJ007) que carecen naturalmente de pCM2, mantienen su patogenicidad, con una virulencia similar a cepas que, si lo contienen, por lo que se indica claramente que la presencia de este no es universalmente requerida para la patogenicidad. Al parecer, el plásmido pCM1 contribuye en mayor porcentaje a la virulencia, pero el rol de pCM2 es dependiente de la cepa.

Załuga *et al.* (2014) llevaron a cabo el análisis de genómica comparativa secuenciando el genoma completo de la cepa no patógena LMG 26808, para su comparación con la cepa de referencia NCPPB 382, con el objetivo de tener un mayor conocimiento de los factores genéticos ligados al estilo de vida de la bacteria, así como los factores determinantes para la patogenicidad. Los resultados revelaron que la cepa no patógena carecía de los plásmidos pCM1 y pCM2, además de no contener factores de virulencia importantes reportados para cepas patógenas (como *celA* y *pat-1*). Además, se encontró un menor contenido de genes que codifican para proteínas involucradas en la degradación de pared celular y proteínas extracelulares como serinas proteasas. Así mismo,

se encontró que algunos de los genes de virulencia putativos estaban presentes en la cepa LMG 26808, sugiriendo que estos genes contribuyen en la aptitud general de la bacteria, por lo que la capacidad de la bacteria para ser patógena dependerá de la presencia de genes adicionales que le permitan una colonización y adaptación al hospedante.

Valenzuela et al. (2018) realizaron la caracterización de 25 cepas aisladas en diferentes sitios de la zona central de Chile y determinaron la relación filogenética de éstas con cepas de otras partes del mundo. El análisis de tipificación multilocus de secuencias (MLSA-MLST) separó las cepas en tres grupos de secuenciotipos (32, 18 y 36), donde dos pertenecían a un mismo linaje. Este estudio demostró que las cepas aisladas en la zona centro de Chile exhiben una baja diversidad genómica entre ellas, sin embargo, tienden a ser clonales y contienen perfiles genéticos similares a cepas de otros países. Por otro lado, los ensayos de virulencia con el cultivar Poncho Negro revelaron que todas las cepas analizadas fueron patógenas mostrando síntomas típicos de cancro bacteriano, destacando que presentaron virulencia diferencial según la cepa, lo cual se reflejó en la severidad de los síntomas desde la aparición de un cancro negro en el sitio de la inoculación hasta marchitamiento severo.

Méndez et al. (2020) analizaron los genomas y el contenido de los factores de virulencia de las cepas VL527, MSF322 y OP3 caracterizadas en un estudio previo (Valenzuela *et al.*, 2018) y representativas de los tres diferentes secuenciotipos identificados con el objetivo de relacionar su virulencia con el contenido de información genómica. Se identificaron diferencias en su composición de plásmidos y diferencias en la localización de los genes contenidos en éstos con respecto a la cepa de referencia NCPPB 382, en la cual pCM1 y pCM2 contienen el gen *celA* y *pat-1*, respectivamente. Sin embargo, en las cepas MSF322 y VL527, ambos genes se encuentran en el equivalente a pCM2, en cambio, en la cepa OP3 se encuentran distribuidos de la misma forma que en NCPPB 382. En el caso del gen *ppaJ*, que está localizado en pCM1 de la cepa de referencia, se encuentra en los equivalentes a pCM2 de VL527, MSF322 y OP3. Por otro lado, se encontró que los genes de virulencia en cepas patógenas son altamente conservados, principalmente los miembros de la isla de patogenicidad *chp/tomA*. A pesar de que las tres cepas poseen una baja diversidad genómica, presentaron virulencia diferencial en el cv. San Pedro, lo cual relacionaron con la existencia de genes de virulencia clave como *pelA1* ya que este gen no se presentó en cepas endófitas y presentó la mayor cantidad de polimorfismos.

Valenzuela *et al.* (2021) seleccionaron nueve cepas pertenecientes a cada uno de los tres diferentes

tipos de secuenciotipos caracterizados por Méndez et al. (2020), con el objetivo de revelar las causas de la virulencia diferencial observada en el cv. San Pedro. En este estudio se mostró que las cepas más virulentas tenían una alta actividad de celulasa, mientras que, las cepas que generaron síntomas leves no la presentaban, confirmando el rol esencial del gen *celA* en la patogenicidad de esta bacteria; por otro lado, se encontraron deleciones en los genes *celB*, *xysA*, *pat-1* y *phpA*, las cuales provocaron que sus respectivas proteínas fueran truncadas. Este fenómeno se observó en genes que presentaron homólogos en el genoma; además, el gen *pat-1* mostró no ser un factor determinante en la virulencia ya que su ausencia o no funcionalidad no afectaron la inducción de síntomas.

Oh et al. (2022) generaron el genoma completo de la cepa LMG7333 aislada en Hungría y lo compararon genéticamente con dos cepas de *C. michiganensis* y nueve de otras especies, identificando que la cepa en estudio tiene una composición genómica similar a las de referencia (un cromosoma y dos plásmidos), con esto, se encontró que la alta diversidad genética se encontraba principalmente en los plásmidos.

El trabajo realizado por Malliarakis et al. (2023) en Grecia, evaluó la diversidad filogenética de cepas de *C. michiganensis* aisladas en 11 prefecturas griegas. Para el análisis filogenético se utilizaron 93 cepas, que fueron sometidas a Análisis Multilocus de Secuencias (MLSA, por sus siglas en inglés) donde se encontró una variabilidad de 4.1%, se clasificaron en 38 haplotipos y se determinó que la agrupación filogenética no estaba relacionada con la distribución geográfica. Además, identificaron los genes de virulencia en 39 cepas y por ensayos de virulencia utilizando el cv. Ekstasi se encontró que estas cepas presentaron diferencias en la virulencia. Se identificaron los genes *chpC*, *chpE*, *chpG*, *ppaA*, *ppaC*, *sbtA* y *tomA* en todas las cepas, pero en una de las cepas que no mostró síntomas no se encontró el gen *celA*, indicando la relevancia de este gen. También se determinó que el gen *pat-1*, aun cuando podría contribuir a la patogenicidad, no parece ser esencial, pues no se detectó en cepas que presentaron altos niveles de virulencia.

En México, el enfoque que se le ha dado a la genómica comparativa de cepas de *C. michiganensis* ha sido para evaluar su historia evolutiva (Yañez-Olvera et al., 2023); sin embargo, no hay estudios evaluando la diversidad de factores de virulencia en cepas aisladas en México.

Tomando en cuenta los estudios realizados, se puede resaltar que la mayor parte de la variabilidad genética se debe a los plásmidos, algo establecido por Thapa et al. (2017), fenómeno que puede explicarse por el hecho de que estos plásmidos son conjugativos y que las condiciones de estrés

pueden provocar la pérdida de éstos, así como su readquisición, de manera que se mantengan genes clave para la virulencia y no afecten la especificidad en hospedantes. Asimismo, diversos estudios han mostrado que no es clara la correlación entre el contenido de genes y la virulencia en las cepas dado que los ensayos en planta de tomate muestran virulencia diferencial en las cepas, pero su contenido genético no varía demasiado, incluso observándose que los genes asociados a la virulencia se encuentran conservados en su gran mayoría. No obstante, un punto importante es que, si bien se han identificado diversos polimorfismos en los genes de virulencia tales como deleciones/inserciones puntuales, grandes deleciones y cambios de nucleótidos, no se ha evaluado el papel de estos polimorfismos en la función de dichos genes y el impacto en la severidad de los síntomas durante el desarrollo de la enfermedad. Así mismo, diversos estudios sugieren que la presencia y funcionalidad del gen *celA* en la patogenicidad es esencial, no siendo el caso para el gen *pat-1*. Por tal, el papel funcional de ciertos genes así como el impacto de los polimorfismos en la virulencia de *C. michiganensis* continúan por ser elucidada.

3. HIPÓTESIS

La severidad de los síntomas inducidos por cada una de las cepas de *C. michiganensis* en plantas de tomate no correlaciona con el contenido de los genes de virulencia y depende del genotipo de tomate evaluado, y además el análisis de pangenomas muestra que las cepas presentan diversos genes accesorios y únicos. Todo esto sugiere la posibilidad de que otros genes relacionados a otras funciones, entre éstas la interacción planta-patógeno, contribuyan con el proceso de infección y virulencia del patógeno determinando la severidad de los síntomas en plantas de tomate.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Analizar el perfil de los genes de virulencia y los pangenomas en cuatro cepas de *C. michiganensis* originarias de México y evaluar su relación con la incidencia y severidad de la enfermedad en cinco genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum*).

4.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la incidencia y severidad del cancro producido por las cepas de *C. michiganensis* en plantas de tomate de cinco distintos genotipos incluyendo cultivares y portainjertos.
2. Analizar la variabilidad genética de las cepas de *C. michiganensis* aisladas en México.
3. Identificar los factores de virulencia y sus polimorfismos en las cepas de *C. michiganensis* aisladas en México.
4. Analizar los pangenomas de las cepas de *C. michiganensis* aisladas de México para identificar la diversidad de genes accesorios y únicos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Estrategia Metodológica

La estrategia experimental consistió en la caracterización de cuatro cepas de *C. michiganensis*, originarias de Puebla (CMP) y Morelos (CMM), proporcionadas por el Colegio de Postgraduados (COLPOS), y las cepas CMS1 (Agrícola Belher) y CMS2 (Agrícola Chaparral), originarias del Estado de Sinaloa, respectivamente, y proporcionadas por el laboratorio de Nematología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Subsede Culiacán. La caracterización de las cepas consistió en la evaluación de patogenicidad utilizando el ensayo de hipersensibilidad en hoja de tabaco y posteriormente se evaluaron los niveles de virulencia por medio de ensayos en plantas de tomate de diferentes cultivares y portainjertos. Para la caracterización genómica, se realizó la extracción del ADN genómico de cada cepa, se secuenció, se ensambló y anotó el genoma; posteriormente, el genoma de cada cepa se utilizó para la búsqueda de factores de virulencia reportados para determinar el perfil de las cepas de estudio, así como identificar la variabilidad genética entre ellas y las reportadas en bases de datos, complementado con un análisis pangenómico.

5.2 Cepas Bacterianas y Medios de Cultivo

Las cepas de *C. michiganensis* analizadas en este estudio se activaron a partir de cultivos criopreservados con glicerol a -80°C en medio Mueller Hinton agar (MHA, acrónimo en inglés) a 25°C por 48 h. Para el cultivo en medio líquido se utilizó caldo de soya tripticaseína (TSB, acrónimo en inglés) inoculando directamente una colonia e incubando a 25°C por 24 h con una agitación de 150 rpm en un agitador orbital (VWR).

5.3 Caracterización de la Virulencia de las Cepas Bacterianas

5.3.1 Ensayo de Hipersensibilidad en Hoja de Tabaco.

Se sembraron las cuatro cepas de *C. michiganensis* en medio MHA y se incubaron durante tres días a 25°C. Una vez obtenido el crecimiento, se recolectaron las colonias bacterianas en 5 mL de agua destilada estéril para obtener una suspensión a una concentración de 3×10^8 UFC/mL, usando como referencia el tubo correspondiente a dicha concentración de la escala de McFarland's. Una vez ajustada la concentración, los 5 mL de la suspensión se infiltraron lentamente en los espacios intercelulares de la hoja de tabaco con jeringas para insulina tratando de inocular completamente sin dejar espacios libres. Las plantas inoculadas se mantuvieron a temperatura ambiente entre 26°C y 30°C y los síntomas en la hoja se evaluaron después de 24 h. La prueba se consideró positiva si la zona infiltrada presentaba colapso del tejido (Schaad *et al.*, 2001).

5.3.2 Ensayo de Virulencia

Para evaluar la virulencia de las cepas de *C. michiganensis* se utilizaron 2 portainjertos y 3 cultivares de tomate como se indica en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Lista de los cultivares y portainjertos de tomate utilizados para la evaluación de virulencia de las cepas de *C. michiganensis*.

Nombre	Tipo	Características	Marca
Itzafort	Portainjerto	AR: ToMV: 0-2, Fol: 1-3, For, Pl, Va:1, Vd: 1 RI: M	De Ruiter®
Multifort	Portainjerto	AR: ToMV: 0-2, Fol: 1-3, For, Pl, Va:1, Vd:1 RI: M	De Ruiter®
Aguamiel	Cultivar	AR: ToMV, V:0, Fol: 0, 1, 2, S, TSWV:0 RI: M, TYLCV.	Vilmorin®
Heinz-1015	Cultivar	AR: Vd/Fol: 1,2/Mi/P RI: Eb/Cmm	Heinz®
Cid	Cultivar	AR: Vd:1, Va:1, Fol: 1,2, ToMV RI: M	Harris Moran®

AR: Resistencia alta, RI: Resistencia intermedia, 0-3: Razas, ToMV: Virus del mosaico del tomate, Fol: *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, For: *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*, Pl: *Pyrenochaeta lycopersici*, Va: *Verticillium albo-atrum*, Vd: *Verticillium dahliae*, TSWV: Virus del bronceado del tomate, M: *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita*, *M. javanica*, TYLCV: Virus del rizado amarillo del tomate, P: *Pseudomonas Syringae* pv. Tomato, Eb: *Alternaria solani*, Cmm: *Clavibacter michiganensis*.

Las semillas de tomate se germinaron en charolas de poliestireno de 128 pocillos, a las cuales se agregó sustrato a base de turba de musgo esfágnico (Sogemix PGM). A cada pocillo se le hizo un orificio de aproximadamente 1 cm de profundidad en la base, se colocó una semilla por pocillo y se tapó con sustrato. Posteriormente, las charolas se cubrieron con una bolsa negra y se dejaron en el invernadero para su germinación. Las charolas se revisaron a los cinco días después de la siembra y en caso de haber germinado, se destaparon para exponerlas a la luz del sol. Después de 14 días, las plántulas se trasplantaron a vasos de unicel de 1 L con suelo preparado (arena, limo y fibra de coco, proporción 2:1:1). Después de 7 días, se colocó un palo de madera en cada maceta y la planta se sujetó al palo de madera para que creciera recta.

La inoculación de las cuatro cepas de *C. michiganensis* se realizó a los 35 días después de la germinación. Para ello, las cepas se inocularon en 30 mL de medio TSB en tubos cónicos estériles y se incubaron durante 48 h a 25°C con agitación de 150 rpm. Este cultivo se ajustó con agua destilada estéril a una DO600 de 1.0 en el caso de las cepas CMP, CMM y CMS2, y de una DO600 de 1.5 para la cepa CMS1, para que estuvieran a una concentración equivalente de 1×10^8 UFC/mL, misma que fue corroborada por conteo de colonias en diluciones seriadas y recuento celular mediante la cámara de Neubauer. Para la inoculación, se realizó una herida en el tallo (2 cm por encima del suelo) con un palillo estéril y con una micropipeta se inocularon 20 µL de la suspensión bacteriana ajustada. Como control negativo, se inocularon tres plantas con agua destilada estéril, siguiendo el mismo procedimiento que el descrito para las bacterias. A los 21 días post-inoculación (dpi), se clasificaron las plantas en función de los síntomas de la enfermedad, de acuerdo con la siguiente escala: 0, sin síntomas; 1, cancro en el sitio de la inoculación; 2, cancro extendido en el tallo; 3, amarillamiento y ligero marchitamiento; 4, marchitamiento en todas las hojas; 5, muerte de la planta (Méndez *et al.*, 2020). Para cada cepa bacteriana, se inocularon tres plantas de tomate y el experimento completo se repitió 2 veces. Los resultados de este ensayo se analizaron en Minitab 19, a través de un diseño de dos factores completamente al azar, teniendo como factores

el cultivar o portainjerto y las cepas. La unidad experimental fue una maceta con una planta de tomate inoculada y la variable de respuesta fueron los datos obtenidos de la escala de severidad.

5.4 Caracterización Genómica

5.4.1 Extracción de Material Genético

La extracción de ADN genómico de las cepas CMS1 y CMS2 se realizó siguiendo la metodología de Wilson (2001) con algunas modificaciones. En el caso de las cepas CMM y CMP, ya se habían enviado a secuenciar previamente y se contó con las lecturas crudas. Se inocularon 5 mL de TSB con la cepa (CMS1 o CMS2) y se incubaron durante 24 h a 25°C con una agitación a 150 rpm. Del cultivo fresco se tomó una alícuota de 1.5 mL, se centrifugó durante 5 min a 10,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Este proceso se repitió nuevamente para obtener una pastilla celular equivalente a 3 mL de cultivo. La pastilla celular se resuspendió en 562 µL de buffer TE, se agregaron 5 µL de lisozima (25 mg/mL), se mezcló por inversión y se incubó durante 1 h a 37°C en termomezclador con agitación a 300 rpm. Posteriormente, se adicionaron 30 µL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, se mezcló por vortexeo y se agregaron 3 µL de proteinasa K (20 mg/mL) para incubar 1 h a 37°C en un termomezclador con agitación a 300 rpm. Después se agregaron 100 µL de 5 M NaCl, se mezcló perfectamente por inversión y se adicionaron 80 µL de una solución al 10% de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, acrónimo en inglés) y 0.7 M de NaCl. La muestra se mezcló y se incubó durante 10 min a 65°C. Posteriormente, se adicionó un volumen aproximadamente igual (0.7 a 0.8 mL) de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por vortexeo y se centrifugó a 13,000 rpm durante 15 min. La fase superior (acuosa) se transfirió a un microtubo nuevo, cuidando no tomar la interfase, y se le adicionó un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). La mezcla se agitó en vórtex y se centrifugó durante 5 min a 13,000 rpm a 4°C. Se recuperó la fase acuosa superior, se transfirió a un microtubo nuevo, se agregaron 2 µL de RNAsa A (4 mg/mL) (Promega) y se incubó a 37°C durante 30 min. Después de la incubación, se realizó una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) como se describió previamente. Se recolectó la fase superior, el ADN genómico se precipitó con 2

volúmenes de etanol absoluto y se incubó a -20°C durante 12 horas. Para recuperar la pastilla de ADN genómico, la muestra se centrifugó durante 10 min a 13,000 rpm, se eliminó el sobrenadante, se agregó 1 mL de etanol al 70%, se mezcló por inversión y se centrifugó durante 5 min a 13,000 rpm. Posteriormente, se removi6 cuidadosamente el sobrenadante para dejar solamente la pastilla de ADN y se secó a temperatura ambiente hasta que el etanol se evaporó por completo. Finalmente, el ADN genómico se resuspendió en 100 µL de buffer TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) y la muestra se almacenó a -20°C.

5.4.2 Integridad, Cuantificación y Pureza de ADN Genómico

La integridad del ADN genómico se evaluó a través de electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TAE 1X y teñido con bromuro de etidio. Para ello, 5 µL de la muestra de ADN genómico se mezclaron con 1 µL de 6X loading buffer (Promega), se mezclaron perfectamente por pipeteo y se cargó en un pozo del gel de agarosa. Como marcador de peso molecular se utilizaron 2 µL de 100 pb DNA Ladder RTU (GeneDireX). Las condiciones de corrida fueron 80 V y 250 mA durante 1 h. Posteriormente, el gel se visualizó en un sistema de documentación de geles (Axygen) con luz UV. Se consideró como material genético íntegro la presencia de una banda de alto peso molecular correspondiente al ADN genómico sin mostrar barrido en el carril, lo cual es indicativo de degradación.

Para la cuantificación, la concentración de ADN se determinó con un fluorómetro Qubit 3.0 (Life Technologies) utilizando los kits de alta sensibilidad Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) y de amplio rango Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). La pureza del ADN se determinó por espectrofotometría utilizando el sistema QIAxpert (Qiagen) midiendo las absorbancias (A) a 260 nm, y las relaciones A260/A230 nm y A260/A280 nm.

5.4.3 Secuenciación y Ensamble de Genomas

El ADN genómico bacteriano se consideró para secuenciación con un valor de pureza a partir de

1.8 para la relación A260/A280 y entre 2.0–2.2 para A260/A230. Las muestras de CMS1 y CMS2 para secuenciación se ajustaron a una concentración de 50 ng/μL y se envió un volumen de 20 μL de cada cepa a servicio de secuenciación de Plasmidsaurus Inc. (Oregon, E.U.A.), utilizando la tecnología de Oxford Nanopore (ONT) para lecturas largas y la tecnología de Illumina de lecturas pareadas 2 x 150 pb. En el caso de las cepas CMP y CMM, los datos crudos obtenidos fueron lecturas pareadas 2 x 300 pb y 2 x 150 pb, respectivamente, las cuales se secuenciaron mediante el sistema MiSeq de Illumina por el Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato) y por Analitek S. A. de C. V.

Una vez obtenidas las secuencias de las cepas CMM (secuenciada en Analitek, S.A. de C.V. mediante la plataforma Illumina en lecturas pareadas 2 x 150 pb) y CMP (secuenciada en Cinvestav UGA-Langebio mediante la plataforma Illumina en lecturas pareadas 2 x 300 pb), se realizó la evaluación de la calidad de las lecturas utilizando FASTQC y el filtrado de las lecturas a través de la herramienta Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) en la plataforma Galaxy. Los parámetros de filtrado consistieron en cortes iniciales con Illumina Clip utilizando las secuencias de adaptadores TruSeq3, LEADING con valor de 3, y TRAILING con valor de 3, para ambas cepas; adicionalmente, en el caso de la cepa CMM se utilizó MINLEN de 20 y SLIDINGWINDOW 4:25, mientras que, para la cepa CMP se utilizó MINLEN de 36 y SLIDINGWINDOW 4:15. El ensamble *de novo* de las cepas CMS1 y CMS2 fue proporcionado por Plasmidsaurus, entretanto, el de las cepas CMP y CMM se realizó usando tres diferentes ensambladores A5-miseq pipeline (Coil *et al.*, 2015), SPAdes v3.13.1 (Prjibelski *et al.*, 2020) y Unicycler (Wick *et al.*, 2017) para seleccionar finalmente el ensamble con los mejores parámetros.

5.4.4 Anotación de Genes e Identificación de Factores de Virulencia y de Resistencia a Antibióticos

Para la anotación de los genomas se utilizó la herramienta de software de línea de comandos Bakta (Schwengers *et al.*, 2021). Adicionalmente, se descargaron en formato FASTA las secuencias de los genes de virulencia reportados a la fecha, tomados a partir del genoma de referencia de la cepa

C. michiganensis NCPPB 382 (Accesion GenBank: Cromosoma, AM711867.1; plásmido pCM1, AM711865.1 y plásmido pCM2, AM711866.1) (Cuadro 2). Con las secuencias de los genes de virulencia se generó una base de datos en la herramienta en línea de comando ABRicate (Seemann y Grüning, 2020) para la identificación de genes. Esta base de datos se utilizó para identificar mediante alineamientos las secuencias de cada uno de los genes de virulencia en las cuatro cepas de *C. michiganensis*. Se consideró que una identidad entre 96–100% y una cobertura de al menos 80%, indicó la presencia del gen de virulencia correspondiente. En caso de tener genes con una alta identidad, pero una cobertura baja, las secuencias se revisaron manualmente y se realizaron alineamientos con Clustal Omega para identificar si la baja cobertura se debía a deleciones del gen tomando como referencia los genes del genoma NCPPB 382. La región genómica correspondiente a la isla de patogenicidad (PAI) de cada cepa se visualizó con SnapGene® software (de Dotmatics; disponible en [snapgene.com](https://www.snapgene.com)) para comparar los genes entre cepas.

Cuadro 2. Lista completa de genes de virulencia reportados para *C. michiganensis* NCPPB 382. *, indica pseudogén.

Localización	Gen	Descripción	Locus	Accesión GenBank
Plásmido pCM1	<i>ppaJ</i>	Serina proteasas relacionadas con quimotripsina	pCM1_0023	AM711865.1
	<i>celA</i>	Celulasa	pCM1_0020	AM711865.1
	<i>CmEXLX1</i>	Expansina		Sinonimia con <i>celA</i>
Plásmido pCM2	<i>pat-1</i>	Proteasas S1A de la subfamilia de quimotripsina	pCM2_0054	AM711866.1
	<i>phpA</i>		pCM2_0053	AM711866.1
	<i>phpB</i>		pCM2_0052	AM711866.1
	<i>chpA*</i>	Proteasas S1A de la subfamilia de quimotripsina	CMM_PS_05	AM711867.1
	<i>chpB*</i>		CMM_PS_10	AM711867.1
	<i>chpC</i>		CMM_0052	AM711867.1
	<i>chpD*</i>		CMM_PS_04	AM711867.1
	<i>chpE</i>		CMM_0039	AM711867.1
	<i>chpF</i>		CMM_0053	AM711867.1
	<i>chpG</i>		CMM_0059	AM711867.1
	<i>ppaA</i>		CMM_0041	AM711867.1
	<i>ppaC</i>		CMM_0044	AM711867.1
	<i>ppaB1</i>		CMM_0042	AM711867.1
	<i>ppaB2</i>		CMM_0050	AM711867.1
	<i>ppaD</i>		CMM_0075	AM711867.1

Isla de patogenicidad (PAI)	<i>ppaE</i>		CMM_0071	AM711867.1
	<i>pelA1</i>	Pectinasas	CMM_0043	AM711867.1
	<i>pelA2</i>		CMM_0051	AM711867.1
	<i>tomA</i>	Tomatinasa	CMM_0090	AM711867.1
Cromosoma	<i>ppaF</i>	Serina proteasas relacionadas con quimotripsina	CMM_0764	AM711867.1
	<i>ppaG</i>		CMM_2535	AM711867.1
	<i>sbtB</i>	Subtilasas proteasas	CMM_2536	AM711867.1
	<i>sbtC</i>		CMM_1942	AM711867.1
	<i>ppaH</i>	Serina proteasas relacionadas con quimotripsina	CMM_1947	AM711867.1
	<i>ppaI</i>		CMM_1948	AM711867.1
	<i>xysA</i>	Xilanasas	CMM_1673	AM711867.1
	<i>xysB</i>		CMM_1674	AM711867.1
	<i>pgaA</i>	Poligalacturonasa	CMM_2871	AM711867.1
	<i>endX</i>	Endoglucanasas	CMM_2691	AM711867.1
	<i>endY</i>		CMM_2692	AM711867.1
	<i>expA</i> (CmEXLX2)	Expansina	CMM_1480	AM711867.1
	<i>perF</i>	Perforina	CMM_2382	AM711867.1
	<i>srtA</i>	Sortasa	CMM_0013	AM711867.1
	<i>vatr1</i>	Reguladores transcripcionales	CMM_2645	AM711867.1
	<i>vatr2</i>		CMM_2969	AM711867.1

La detección de los polimorfismos asociados a cada uno de los genes de virulencia identificados en las diferentes cepas se realizó a través de alineamientos del gen de virulencia de las cuatro cepas en estudio y el gen correspondiente de la cepa de referencia *C. michiganensis* NCPPB 382. Una vez identificados los genes y sus respectivos polimorfismos, se obtuvieron sus secuencias de proteína para analizarlas utilizando la base de datos Grupos Idénticos de Proteína en NCBI (Sayers *et al.*, 2023), en búsqueda de cepas que presenten los mismos polimorfismos.

Para la identificación de genes de resistencia a antibióticos se utilizó la base de datos Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD, por sus siglas en inglés), utilizando la herramienta de identificador de genes de resistencia (RGI, por sus siglas en inglés), con el criterio de solo hits perfectos y estrictos (Alcock *et al.*, 2023).

5.4.5 Análisis Filogenómico

Con el fin de confirmar que las cuatro cepas de este estudio pertenecieran al género y especie correspondiente, se utilizaron secuencias de genomas completos disponibles en la base de datos de NCBI. De estos, 15 fueron de *C. michiganensis*: A4758 ([ASM2352083v1](#)), CMM84 ([ASM2061617v1](#)), CMM04 ([ASM2061623v1](#)), CMM21 ([ASM2862302v1](#)), LMG 7333 ([ASM2121665v1](#)), UF1 ([ASM973965v1](#)), CMM09 ([ASM2061619v1](#)), CMM39 ([CP085140](#)), NCPPB 382 ([ASM6348v1](#)), MSF322 ([ASM1199566v1](#)), N.P. ([ASM2298325v1](#)), A5747* ([ASM2352081v1](#)), VL527 ([ASM1199588v1](#)), VQ28 ([ASM1926376v1](#)) y VQ143 ([ASM1926378v1](#)) y una endófita CFBP 7494 ([ASM215116v1](#)). Así como representantes de otras especies, *C. sependonicus* ATCC 33113 ([ASM6922v1](#)), *C. capsici* PF008 ([ASM128020v1](#)), *C. zhangzhongii* DM1 ([ASM1477565v1](#)), *C. californiensis* CFPB 8216 ([ASM2195286v1](#)), *C. insidiosus* R1-1 ([ASM95846v1](#)) y ATCC 10253 ([ASM307635v1](#)), *C. tessellarius* ATCC 33566 ([ASM224063v1](#)), *C. nebraskensis* NCPPB 2581 ([ASM35569v1](#)), *C. phaseoli* LPPA 982 ([ASM2192292v1](#)). Con estas secuencias se realizó el análisis de identidad promedio de nucleótidos calculada en base a MUMmer (ANIm, por sus siglas en inglés) en JSpeciesWS (Richter *et al.*, 2016) generando una matriz de identidad promedio de nucleótidos entre los diferentes genomas, con la cual se generó un mapa de calor realizado con la función *heatmap* versión 1.0.8 en RStudio (Kolde, 2019).

5.4.6 Análisis de Diversidad Genética MLST

Con el objetivo de analizar las cepas aisladas en México y compararlas con cepas aisladas en otros países, se llevó a cabo la Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST, por sus siglas en inglés), para esto se realizó la identificación de cinco genes constitutivos (*housekeeping*, en inglés): *atpD*, *dnaK*, *gyrB*, *recA* y *sdhA* (Valenzuela *et al.* 2018; Malliarakis *et al.*, 2023) en cada una de las cuatro cepas de este estudio; tres aisladas en México: CMM_04 ([ASM2061623v1](#)), CMM_09 ([ASM2061619v1](#)) y CMM_84 ([ASM2061617v1](#)); 12 cepas aisladas en EE. UU.: A5747 ([ASM2352081v1](#)), CFBP8019 ([ASM215112v1](#)), CFBP7494 ([ASM215116v1](#)), CFBP8017

(ASM215118v1), PvP098 (ASM1690708v1), PvP036 (ASM1787689v1), CASJ002 (ASM215093v1), CASJ006 (ASM215094v1), CA00002 (ASM215098v1), CAYO001 (ASM215100v1), CASJ005 (ASM215105v1) y CASJ003 (ASM215106v1); dos cepas aisladas en China: A4758 (ASM2352083v1) y CFBP7312 (ASM979626v1); cinco cepas aisladas en Chile: MSF322 (ASM1199566v1), VL527 (ASM1199588v), OP3 (ASM1179978v1), VQ143 (ASM1926378v1) y VQ28 (ASM1926376v1); dos cepas aisladas en Hungría: LMG7333 (ASM2121665v1) y CFBP 4999 (ASM369729v1); una cepa aislada en República Checa: UF1 (ASM973965v); dos cepas aisladas en Países Bajos: LMG 26808 (Cm26808.1) y CFBP 3399 (ASM1859832v1); una cepa aislada en Italia: ATCC 14456 (ASM979318v1); una cepa aislada en Reino Unido: NZ2541 (ASM979292v1); tres cepas aisladas en Francia: CFBP6885 (ASM979600v1), CFBP7488 (ASM979604v1) y CFBP1465 (ASM979612v1); y dos cepas aisladas en Rusia: 1217 (ASM1489355v1), VKM Ac-1790 (ASM1535119v1). Una vez identificados, las secuencias de cada uno de los genes de una misma cepa se concatenaron en el programa en línea de comandos CONCAT (Singh, 2019) y posteriormente se alinearon con CLUSTALW, dentro de MEGA XI (Tamura *et al.*, 2021), donde se realizó la construcción del árbol utilizando el algoritmo de Máxima verosimilitud y el modelo de Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa *et al.*, 1985). con un bootstrap de 500.

5.4.7 Análisis de Pangenomas

El análisis de pangenoma se llevó a cabo en la herramienta de línea de comandos Anvi'o v8 (Delmont y Eren, 2018; Eren *et al.*, 2020) utilizando los genomas de las cuatro cepas de este estudio y la cepa de referencia NCPPB 382, siguiendo el flujo de trabajo de pangenomas <https://merenlab.org/2016/11/08/pangenomics-v2/>. Se generaron las bases de datos de los archivos FASTA usando el comando `anvi-gen-contigs-database`, para la anotación de las bases de datos generadas se utilizaron los comandos `anvi-run-scg-taxonomy`, `anvi-run-ncbi-cogs` (obtención de clusters de grupos ortólogos utilizando la base de datos de NCBI), `anvi-run-hmms` (para dominios conservados) y `anvi-scan-trnas` (para identificación de ARN de transferencia), una vez anotadas las bases de datos, se generó una base de datos de todos los genomas con el comando `anvi-gen-`

genomes-storage, con esta se creó el pangenoma con el comando `anvi-pan-genome` y se visualizó con el comando `anvi-display-pan`.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Ensayo de Hipersensibilidad en Hojas de Tabaco.

Inicialmente, se decidió evaluar la patogenicidad de las cepas de *C. michiganensis* aisladas de diferentes regiones de México, para ello se realizó la prueba de hipersensibilidad en tabaco. Las cuatro cepas de *C. michiganensis* produjeron una respuesta positiva a las 24 h, presentando los síntomas distintivos de colapso del tejido y la generación de necrosis en el área infiltrada (Fig. 3). Estos resultados indicaron que las cepas de *C. michiganensis* se pueden considerar fitopatógenas, ya que este ensayo indicó la producción de enzimas que provocan el ablandamiento y la desintegración de las sustancias de la pared celular, permitiendo la penetración del patógeno y su propagación en los tejidos, provocando el colapso y la desintegración de su estructura celular (Schaad *et al.*, 2001). En este caso, la reacción de hipersensibilidad corresponde a un mecanismo de defensa general que involucra la muerte celular para evitar la diseminación del patógeno hacia otros tejidos en la planta, siendo *Nicotiana tabacum* una de las plantas más utilizadas dado que sus hojas presentan espacios intervenales grandes que se pueden infiltrar fácilmente, aunque no sea la hospedante natural del patógeno (Ramírez y Amador, 2009). Se sabe que para el caso de *C. michiganensis*, el producto del gen *chpG*, miembro de la familia *pat-1* de serinas proteasas, desencadena la respuesta de hipersensibilidad en especies de *Nicotiana* (Lu *et al.*, 2015; Oh *et al.*, 2022); sin embargo, este gen no se encontró en la cepa CMP aunque sí se observó un resultado positivo de hipersensibilidad, lo cual sugiere que en la cepa CMP podría haber otros genes asociados a la respuesta de hipersensibilidad. Considerando estos resultados, se procedió a evaluar la virulencia de las cepas en plantas de tomate.

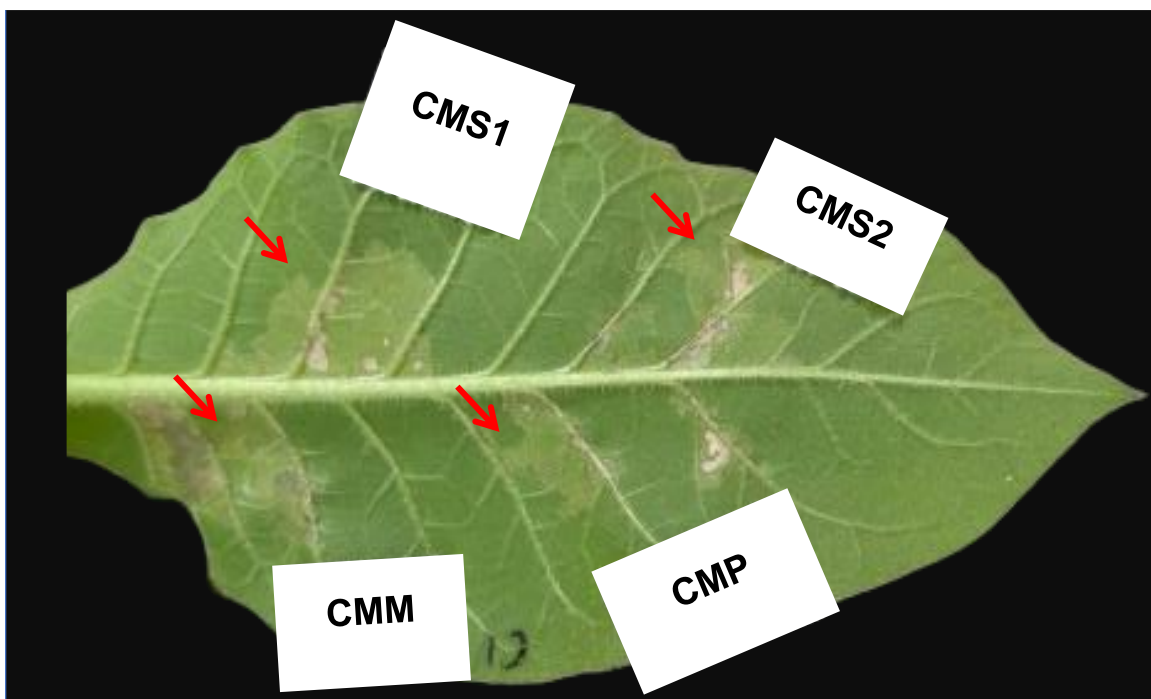


Figura 3. Resultados de ensayo de hipersensibilidad en hoja de tabaco. Las flechas rojas indican las regiones de necrosis en la hoja de tabaco, lo cual es indicativo de la patogenicidad de la cepa analizada. Cepas de *C. michiganensis* evaluadas: CMP, originaria de Puebla; CMM, originaria de Morelos; CMS1 y CMS2, originarias de Sinaloa.

6.2 Ensayo de Virulencia en Plantas de Tomate.

Considerando los resultados de hipersensibilidad en tabaco, se realizaron ensayos de virulencia en plantas de tomate para validar la patogenicidad de las cepas en su hospedante. Para este ensayo se utilizaron los cultivares Heinz 1015 (el cual reporta en su ficha técnica resistencia intermedia a *C. michiganensis*), Aguamiel y Cid, así como los portainjertos Itzafort y Multifort. Como resultados se observó que hubo un 100% de incidencia de la enfermedad en las plantas inoculadas con cualquiera de las cuatro cepas de *C. michiganensis* analizadas, ya que todos los cultivares y los portainjertos inoculados presentaron síntomas. Con el objetivo de identificar el cultivar más susceptible o resistente, se compararon los datos de la escala de severidad obtenidos al evaluar hasta los 21 dpi teniendo como un factor el material vegetal. El análisis mostró que de manera general hubo diferencias significativas entre algunos cultivares y portainjertos, donde el cultivar Aguamiel resultó significativamente (3.5) más susceptible que los portainjertos Itzafort y Multifort

(Fig 4). Es de importancia destacar que el cultivar Heinz 1015 a pesar de que reporta resistencia intermedia a *C. michiganensis*, se observó que no presentó diferencias significativas con los materiales de tomate analizados, indicando que no es resistente al patógeno. Por otro lado, los resultados indicaron que los únicos materiales que resultaron ser más tolerantes a las cepas de *C. michiganensis* fueron los portainjertos Itzafort y Multifort, presentando en promedio la menor severidad de la enfermedad y estadísticamente significativa al comparar con Aguamiel.

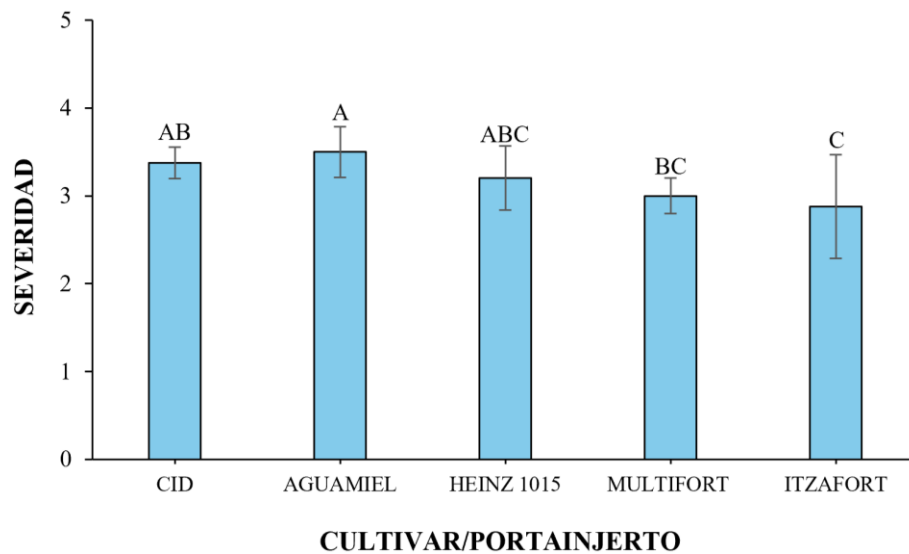


Figura 4. Evaluación de la severidad de los síntomas por cultivar/portainjertos ocasionados en general por las cepas de *C. michiganensis*. Las letras no compartidas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ por la prueba LSD de Fisher). Las barras representan el error estándar de la media.

Por otro lado, el análisis estadístico aplicado solo al factor de las cepas de *C. michiganensis* mostró que solo hubo diferencias significativas entre la cepa CMS1 y CMM, mientras que, las cepas CMP y CMS2 no resultaron estadísticamente diferentes (Fig. 5), indicando que la cepa CMM fue la menos virulenta comparada con la cepa CMS1.

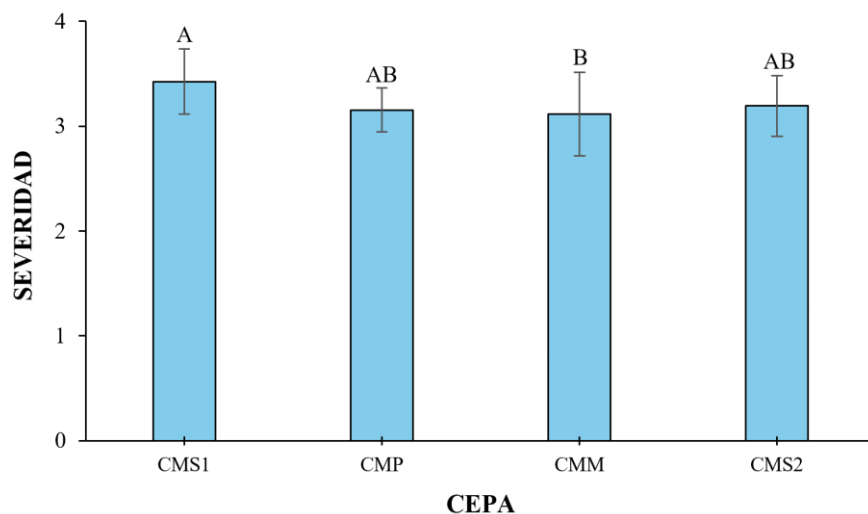


Figura 5. Evaluación de la severidad de los síntomas tomando como factor la cepa de *C. michiganensis* inoculada en las plantas de tomate. Las letras no compartidas indican diferencias significativas ($p < 0.05$ por la prueba de LSD de Fisher). Las barras representan el error estándar de la media.

Considerando que el factor que resultó contribuir más a la variabilidad de los datos fue la interacción de cultivar/portainjerto y cepa, se realizó un análisis comparativo del promedio de la escala de severidad de cada una de las cepas de *C. michiganensis* en cada material de tomate utilizado para identificar si alguna de las cepas era más virulenta en algún cultivar o portainjerto. En el caso de los cultivares, se observó que no hubo diferencias significativas en cuanto al promedio de la severidad causada por las 4 cepas de *C. michiganensis* en los cultivares Cid y Heinz 1015; a diferencia del cultivar Aguamiel, donde las únicas cepas que presentaron diferencias significativas en cuanto a la severidad de la enfermedad ocasionada fueron las cepas CMS2 y CMP con la cepa CMS1, resultando ésta última como la más virulenta (Fig. 6). En el caso del cv. Cid, aunque no se presentaron diferencias significativas en cuanto a la virulencia de las cuatro cepas (Fig. 6A, 7A), numéricamente la cepa CMS2 reportó los valores más altos de severidad con una media de 3.6 de acuerdo con la escala usada. Ninguna cepa presentó diferencias significativas en la severidad de la enfermedad en el cultivar Heinz 1015 (Fig. 6B, 7B), presentando la cepa CMM los valores más altos, con una media de 3.8 (Fig. 6C, 7C).

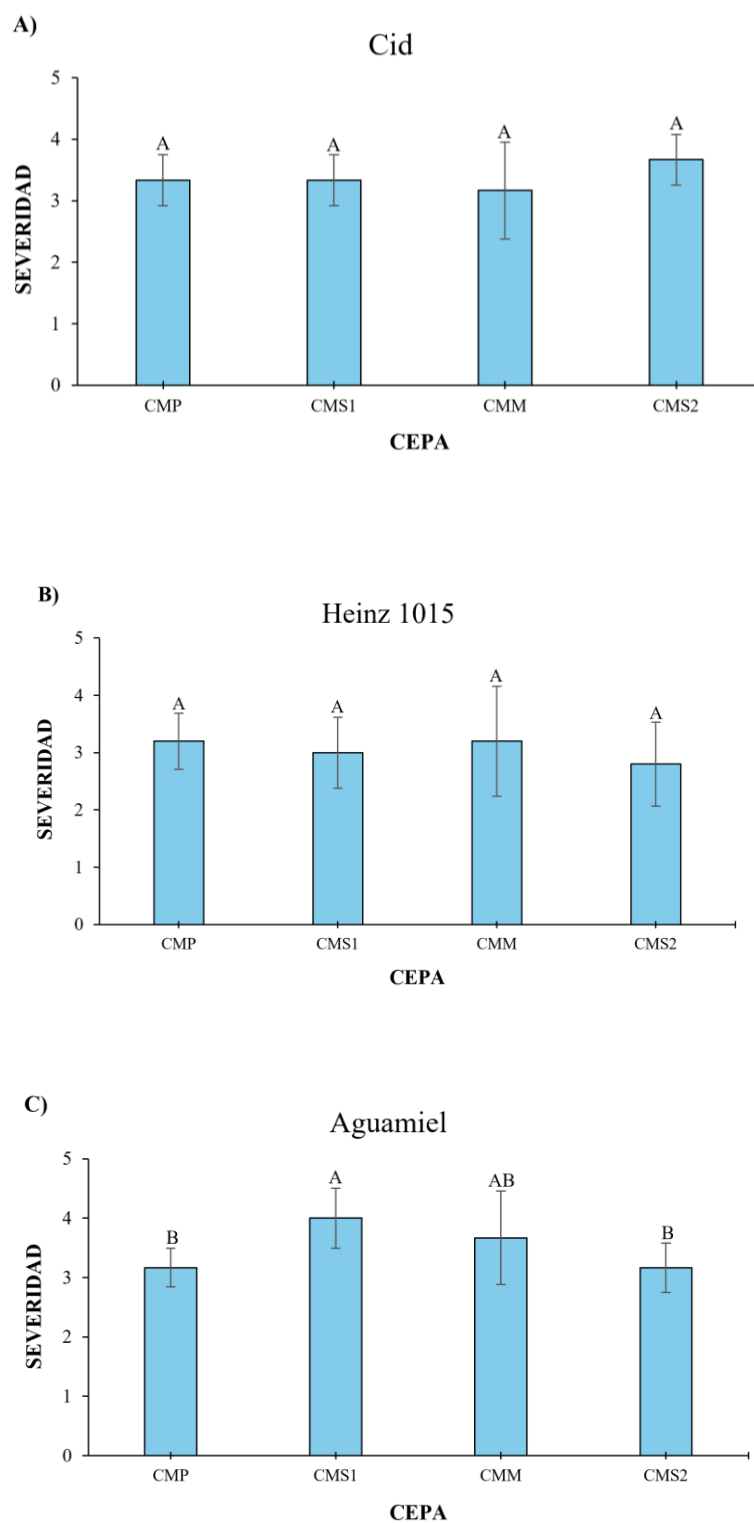
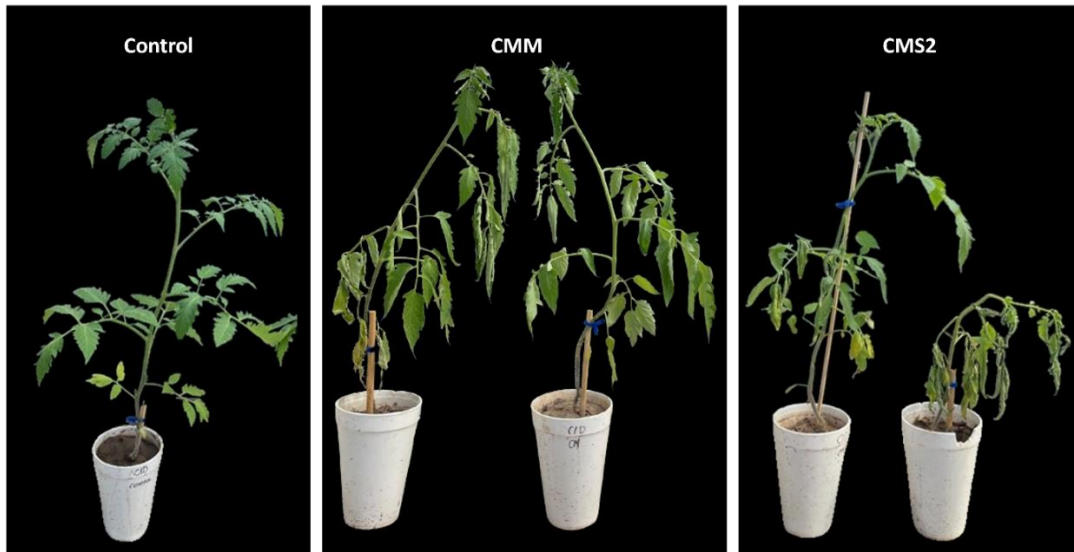
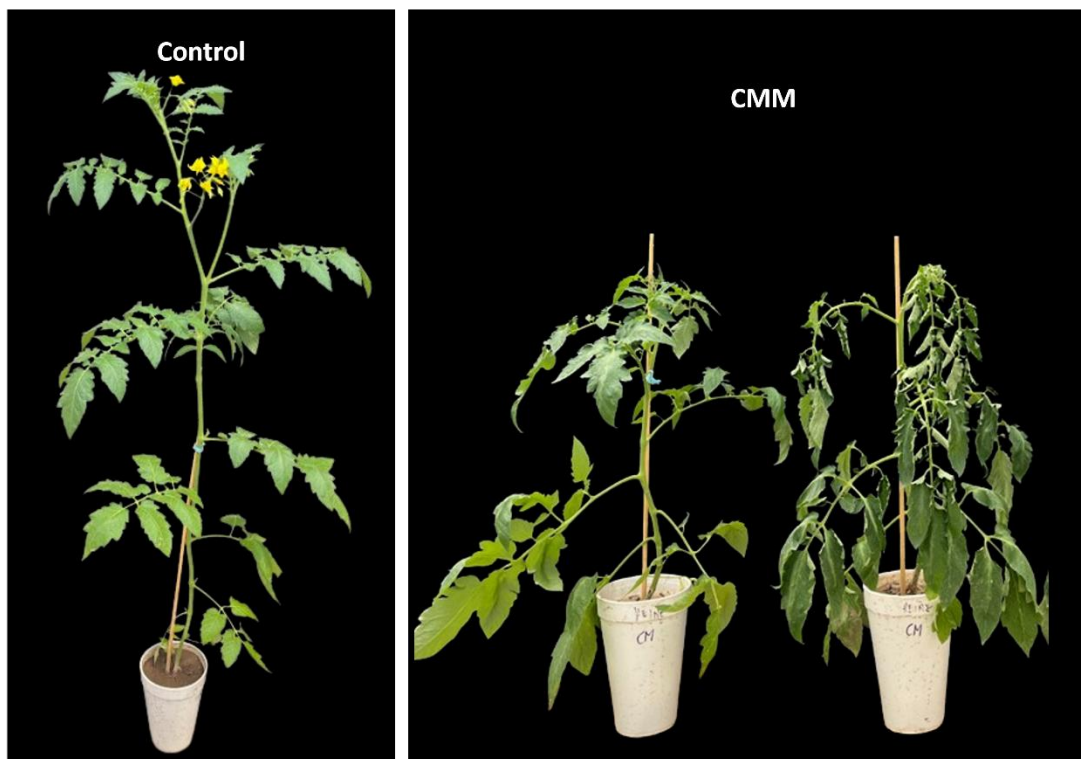


Figura 6. Análisis de severidad de las cepas de *C. michiganensis* en los cultivares A) Cid, B) Heinz 1015, y C) Aguamiel. Las cepas que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$ por la prueba LSD de Fisher). Las barras representan el error estándar de la media.

A)



B)



c)

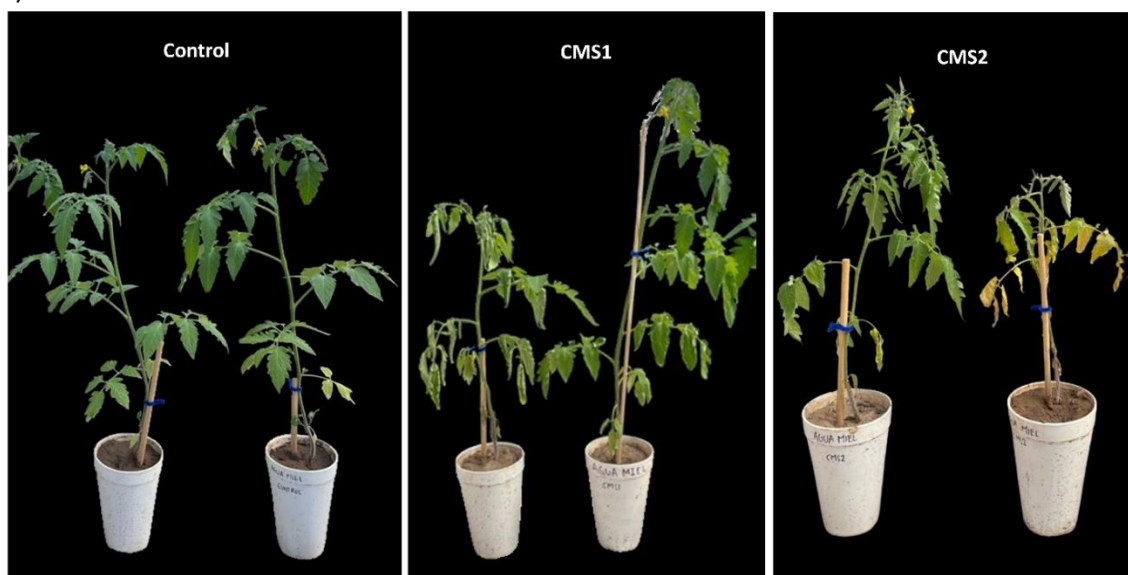


Figura 7. Ensayo de virulencia de cepas de *C. michiganensis* en los cultivares A) Cid, B) Heinz 1015, y C) Aguamiel. La cepa inoculada se indica en letras blancas, así como el control sin inocular.

En el caso de los portainjertos, en Multifort se observó que la cepa CMP presentó valores promedio de severidad de 3.4 siendo significativamente más virulenta que las cepas CMS1 y CMS2. No hubo diferencias significativas de la cepa CMM comparada con las cepas CMP, CMS1 y CMS2 (Fig. 8A, 9A). Por otro lado, en el caso de Itzafort, se observaron diferencias significativas, donde la cepa CMS1 presentó una escala de severidad con una media de 4, siendo significativamente diferente de CMM y CMP. Por otro lado, los valores más bajos de severidad se obtuvieron con la cepa CMM con una media de 1.5 que resultó significativamente diferente de las cepas CMS1 y CMS2, las cuales presentaron los valores más altos de severidad (Fig. 8B, 9B).

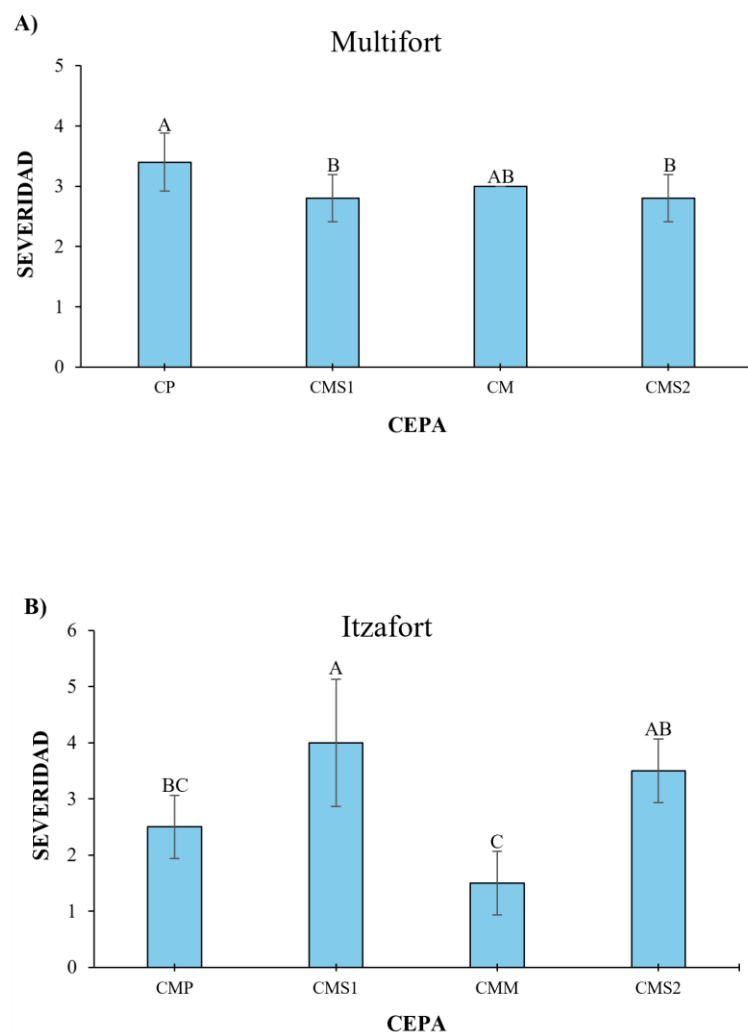


Figura 8. Análisis de la escala de severidad de las cepas de *C. michiganensis* en portainjertos de tomate. A) Multifort, y B) Itzafort. Las cepas que no comparten letra son significativamente diferentes ($p < 0.05$) por la prueba LSD de Fisher. Las barras representan el error estándar de la media.



Figura 9. Ensayo de virulencia de cepas de *C. michiganensis* en portainjertos de tomate. A) Multifort, y B) Itzafort. La cepa inoculada se indica en letras blancas, así como el control sin inocular.

Con estos resultados, podemos sugerir que la capacidad de virulencia de las cepas parece estar estrechamente relacionada con el genotipo del hospedante, ya que en los materiales Aguamiel e Itzafort, la cepa CMS1 causó los niveles de severidad más altos, mientras que, para Multifort fue la cepa CMP; en el caso de los cvs. Cid y Heinz 1015 no hubo una cepa que fuera la más virulenta. Interesantemente, la cepa CMM fue la única que indujo los valores significativamente más bajos de severidad en el portainjerto Itzafort (Fig. 8B). Considerando esto, resulta interesante que el cultivar Heinz 1015 no presentó mayor tolerancia a las cepas en estudio, entretanto, el portainjerto Itzafort sí presentó niveles muy bajos de enfermedad con algunas cepas, lo que podría sugerir que el portainjerto Itzafort podría ofrecer más tolerancia a la enfermedad ocasionada por algunas cepas de *C. michiganensis*.

Existen pocos estudios que evalúen la severidad del cancro en diferentes cultivares y portainjertos de tomate. Se sabe que generalmente en las especies de tomate silvestres, *C. michiganensis* tiene menor capacidad de producir síntomas y además la población bacteriana es menor, comparando estos resultados con cultivares susceptibles (Francis *et al.*, 2001; Nandi *et al.*, 2018; Sen *et al.*, 2013). Un estudio reciente evaluó la tolerancia a la infección por *C. michiganensis* en 24 cultivares diferentes de tomate en Irán (Sour *et al.*, 2023). En este estudio relacionaron que el progreso de la enfermedad positivamente se correlacionó con el tiempo de inicio y la severidad de la enfermedad, encontrando cinco cultivares con mayor tolerancia entre los evaluados, los cuales desarrollaron síntomas a partir de 12 dpi con un máximo de 33% de severidad; en contraste, los cultivares susceptibles mostraron síntomas a partir de los 3 dpi con un máximo de 77.38% de severidad. Estos estudios indican que el genotipo de la planta es muy importante en la interacción planta-patógeno, lo cual puede explicar la virulencia diferencial de las cepas en diferentes genotipos hospedantes. Por otro lado, se ha reportado que la composición de la savia del xilema de las plantas de tomate pudiera ser un factor limitante en el crecimiento y la propagación del patógeno (Lowe-Power *et al.*, 2018). Con esto puede suponerse que las plantas pueden responder a la infección por parte del patógeno, liberando sustancias específicas a la savia del xilema para combatir al crecimiento bacteriano, por otro lado también se propone la posibilidad de que las plantas que resultan ser más tolerantes como es el caso del portainjerto Itzafort, puedan carecer de ciertas señales de quorum-sensing para inhibir la virulencia de *C. michiganensis*, como se observó para *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Cellini *et al.*, 2020).

6.3 Ensamble y Anotación de Genomas.

Considerando las diferencias en la virulencia de las cepas en estudio, se llevó a cabo la secuenciación del genoma para caracterizarlas a nivel molecular e identificar diferencias en el perfil de genes de virulencia y polimorfismos asociados a las diferentes cepas de *C. michiganensis*.

Tras el análisis de los ensamblajes en las tres plataformas, se seleccionó el ensamblaje obtenido con Unicycler (503 contigs, N50: 10,181, L50: 88 Cobertura: 104.3x) para la cepa CMM y el ensamblaje obtenido por A5-miseq (49 contigs, N50: 140,551, L50: 8 Cobertura: 140.7x) para la cepa CMP, donde el criterio que se utilizó fue que el ensamblaje produjera el menor número de contigs y que además el tamaño de éstos en su mayoría fuera mayor a 500 pb, obteniendo genomas en calidad borrador para ambas cepas, razón por la cual no se pudieron identificar los plásmidos (Cuadro 3). Los ensamblajes de las cepas CMS1 y CMS2 aisladas en Sinaloa generaron genomas cerrados de 3,426,399 pb (72.5% GC) y 3,413,098 pb (72.6% GC), respectivamente. El ensamblaje del genoma de CMS1, resultó en tres contigs, correspondientes al cromosoma y dos plásmidos. Para identificar los plásmidos se realizaron alineamientos en BLASTN utilizando la cepa NCPPB 382 como referencia, obteniéndose que el contig 1 con una profundidad de 144.8 x, presentó un 99.48% de identidad con pCM1 (23% de cobertura), el cual se nombró pCMS1-1 (66.7% GC); aunque la cobertura con la cepa NCPPB 382 fue baja, este contig tuvo una cobertura de 55% con el plásmido pCM1 de la cepa LMG7333 ([CP080437.1](#)). El contig 2 con una profundidad de 162.7x, presentó un 97.98% de identidad con pCM2 (56% de cobertura), que se nombró pCMS1-2 (67.3% GC). Asimismo, para la cepa CMS2 se obtuvieron 3 contigs correspondientes al cromosoma y dos plásmidos. Siguiendo el mismo procedimiento que con la cepa CMS1, se identificó que el contig 1 con una profundidad de 152.6 x, mostró una identidad de 99.49% con el plásmido pCM1 de la cepa NCPPB 382 (25% de cobertura) y se nombró como pCMS2-1 (66.9% GC), presentando además una cobertura de 61% con el plásmido pCM1 de la cepa LMG7333 ([CP080437.1](#)). Por su parte, el contig 3 con una profundidad de 258.7x, tuvo una identidad de 98.38% con el plásmido pCM2 (56% de cobertura) de la cepa NCPPB 382, por lo que se nombró pCMS2-2 (67.3% GC). El porcentaje de GC de los genomas de las cepas en estudio fue similar a los reportados en genomas en bases de datos y otros estudios, siendo este mayor a 72% (Méndez *et al.*, 2020; Oh *et al.*, 2022). Sin embargo, se encontró que los plásmidos variaron en tamaño, donde se observó que el plásmido

menos conservado tanto en tamaño como en contenido genético es pCM1 (Thapa *et al.*, 2017). Este patrón se registró en las cepas de este estudio, donde los plásmidos tipo pCM1 identificados presentaron tamaños diferentes siendo pCMS1-1 de 51,553 pb y pCMS2-1 de 46,226 pb; en el caso de los plásmidos tipo pCM2 de las cepas de Sinaloa (pCMS1-2 y pCMS2-2) tienen exactamente el mismo tamaño (75,105 pb), lo cual fue muy similar al plásmido pVL2 (75 kb) de la cepa VL25 (Méndez *et al.*, 2020).

La anotación de los genomas realizado con Bakta y ABRicate revelaron que los genomas contienen más de 3000 genes codificantes (CDS) y entre 45 y 46 genes codificando ARNt. La cantidad de CDS y ARNt coincide con lo observado para otras cepas como es el caso de VL527, MSF322 y OP3 (Méndez *et al.*, 2020). Interesantemente, la cepa CMM fue la que presentó un mayor número de pseudogenes con un total de 12, mientras que, las otras cepas presentaron de 6 a 7 pseudogenes. La cantidad de genes codificantes coincide con las de otras cepas reportadas en la base de datos del NCBI, incluyendo la cepa de referencia utilizada en este estudio (NCPPB 382) y UF1, reportando éstas, un número mayor a 3000. Sin embargo, en el caso de los pseudogenes se encontraron relativamente pocos en las cepas de este estudio en comparación con lo encontrado en las cepas chilenas VL527, MSF322, OP3, donde se encontraron 41, 45 y 55 pseudogenes, respectivamente (Méndez *et al.*, 2020).

Cuadro 3. Características genómicas y estadísticas de calidad del ensamble de genomas de las cepas CMM, CMP, CMS1 y CMS2 de *C. michiganensis*.

^a Características	CMM	CMP	CMS1	CMS2
Calidad final	Draft	Draft	Genoma cerrado	Genoma cerrado
Lecturas crudas	1,399,935	1,553,537	-	-
Lecturas filtradas	1,196,869	1,094,316	-	-
Plataformas de secuenciación	Illumina 2 x 150 pb (Analitek)	Illumina 2 x 300 pb (Langebio)	Illumina 2 x 150 pb + Oxford Nanopore	Illumina 2 x 150 pb + Oxford Nanopore
Ensamblador	UNICYCLER v0.5.0	A5-miseq	Servicio PlasmidSaurus	Servicio PlasmidSaurus
Anotación	Bakta v1.8.1	Bakta v1.8.1	Bakta v1.8.1	Bakta v1.8.1
N50 (pb)	10,181	140, 551	3,299,741	3,291,767
Cromosoma (pb)	---	---	3,299,741	3,291,767
Plásmidos	---	---	51, 553 pb (pCMS1-1) 75,105 pb (pCMS1-2)	46,226 pb (pCMS2-1) 75,105 pb (pCMS2-2)
No. de Contigs	503	49	3	3
Longitud total (pb)	3,154,189	3,459,854	3,426,399	3,413,098
Contenido de GC (%)	72	72.52	72.5	72.6
CDS	3,029	3, 248	3,216	3,217
Pseudogenes (total)	12	7	6	7
ARNr	1 x 5S, 1 x 16S, 1 x 23S	3 x 5S, 1 x 16S, 1 x 23S	2 x 5S, 2 x 16S, 2 x 23S	2 x 5S, 2 x 16S, 2 x 23S
ARNt	45	45	46	45
CRISPR	1	1	1	1

^a Características de acuerdo con la anotación por Bakta. CDS: Regiones codificantes, por sus siglas en inglés.

6.4 Análisis Filogenómico de las Cepas de *C. michiganensis*

A los genomas ensamblados de las cepas en estudio se les realizó un análisis filogenómico para corroborar su identidad. Para ello, se generó una matriz con los valores de la identidad promedio de nucleótidos calculada en base a MUMmer (ANIm, por sus siglas en inglés) de las cepas de interés y genomas disponibles en las bases de datos de *C. michiganensis* y otras especies

relacionadas del género *Clavibacter*. Como resultado se observó que las cuatro cepas en estudio se agruparon en el mismo clado de los genomas de cepas pertenecientes a la especie de *C. michiganensis* con una identidad mayor a 98%, indicándonos que las cepas caracterizadas en este trabajo pertenecen a la especie *C. michiganensis* (Méndez *et al.*, 2020) (Fig. 10). Por otro lado, los porcentajes de ANIm con otras especies del género *Clavibacter* presentaron porcentajes de identidad menores a 95% coincidiendo con Méndez *et al.* (2020); no obstante, en este estudio se incluyó la cepa endófitica de *Clavibacter* sp. CFBP7494 que presentó un valor de ANIm de aproximadamente 93%; este resultado fue similar al estudio de Méndez *et al.* (2020), donde para el análisis filogenómico utilizaron la cepa endófitica de *C. michiganensis* CASJ009 presentando un valor de ANI de 88%, y sugieren que las cepas endófitas no patógenicas de *Clavibacter* sp. son muy diversas entre ellas y aunque pueden colonizar el tomate no causan la enfermedad. Mientras, los valores de ANIm para las especies *C. tessellarius* y *C. capsici* fue de 92% dato similar a lo reportado por Osdaghi *et al.*, (2018) que reportó un 90% para estas especies.

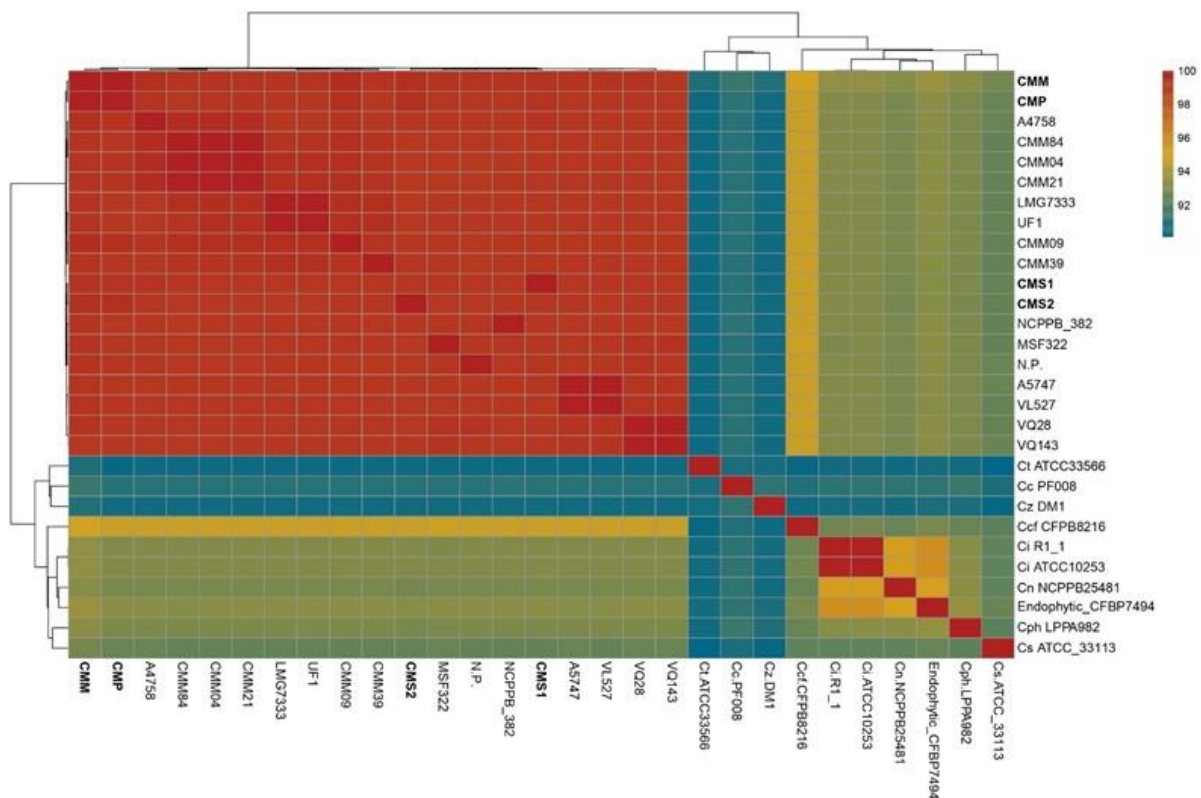


Figura 10. Análisis filogenómico del valor ANIm de las cepas en estudio (en negritas) visualizado con un diagrama de calor con dendrograma.

6.5 Análisis de Diversidad Genética por MLST

La diversidad de las cepas aisladas en México se analizó a través de MLST, basada en los genes constitutivos *recA*, *gyrB*, *dnaK*, *atpD* y *sdhA*. Este análisis reveló que la diversidad genética entre las cepas aisladas en México es similar con excepción de la cepa CMS1, ya que se pudo observar que las cepas CMM, CMP y CMS2 agruparon en un clado, el cual también agrupó otras cepas con origen en México (CMM 09, CMM 84), Italia (ATCC14456) y China (A4758). Únicamente, la cepa CMS1 se agrupó en un clado distinto, indicando mayor variabilidad genética comparada con las cepas CMM, CMP y CMS2 (Fig. 11). Dado el agrupamiento de las cepas en estudio, así como de otras cepas incluidas en el análisis filogenético, se identificó que el origen de la cepa no está relacionado con su relación genética como previamente se sugirió (Yañez y Barona, 2019), lo cual se apoya en el hecho que la mayoría de los diferentes clados que se formaron agrupan cepas aisladas de diferentes países (Thapa *et al.*, 2017, 2020); esto sugiere que la distribución por clados indica que los linajes encontrados en las cepas de *C. michiganensis* podría deberse a un origen común vinculado con el proveedor de la semilla y no debido al origen geográfico del aislamiento. Asimismo, la alta diversidad genética entre cepas de *C. michiganensis* aisladas en un rango geográfico estrecho, como es el caso de las cepas CMS1 y CMS2 aisladas en Sinaloa, puede atribuirse a la introducción de cepas foráneas, lo cual es un evento común resaltando la importancia de la transmisión por semilla a nivel mundial y que indica la facilidad que tienen estas cepas de adaptarse a nuevos ambientes (Jacques *et al.*, 2012; Kleitman *et al.*, 2008; Milijašević-Marčić *et al.*, 2012; Tancos *et al.*, 2015; Thapa *et al.*, 2017; Wassermann *et al.*, 2017).

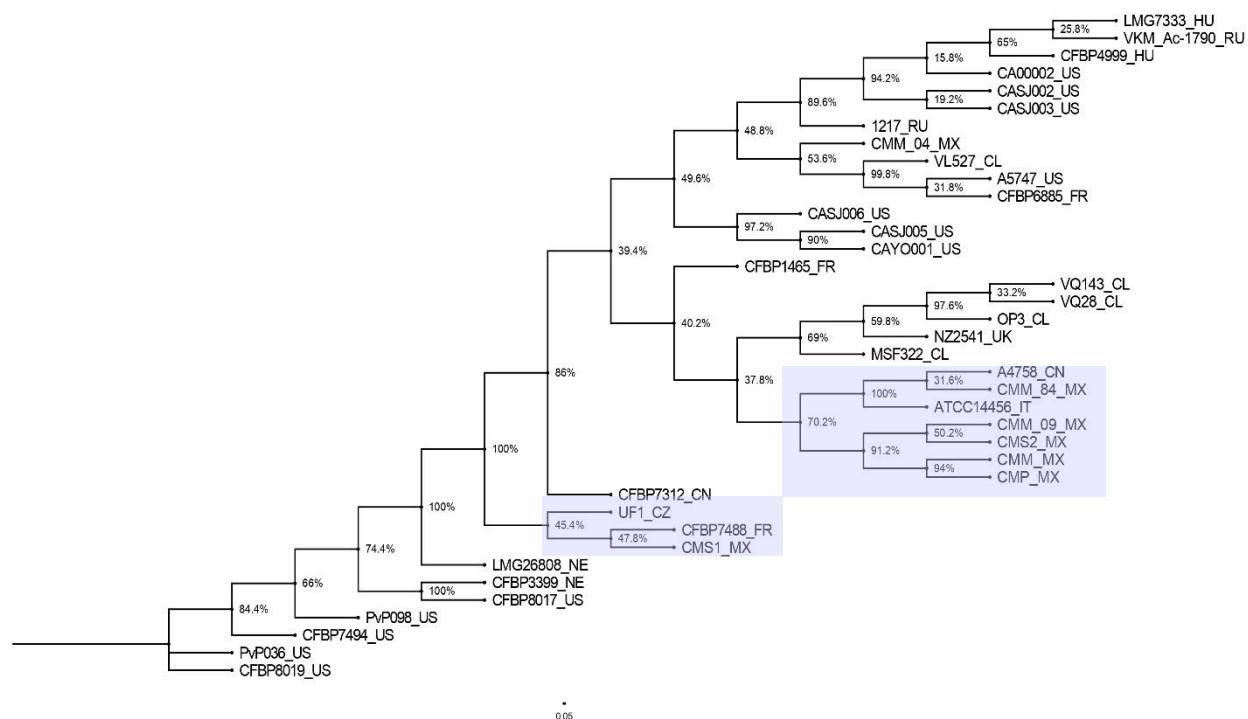


Figura 11. Análisis de diversidad genética de las cepas de *C. michiganensis*. El árbol filogenético se construyó por el modelo de Hasegawa-Kishino-Yano con las secuencias concatenadas de los genes constitutivos *recA*, *gyrB*, *dnaK*, *atpD* y *sdhA* de cepas de *C. michiganensis* de diferentes orígenes geográficos. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) se muestran en las ramas. Se indica el origen de las cepas: CL = Chile; FR = Francia; US = E.U.A; IT = Italia; HU = Hungría; UK = Reino Unido; NE = Países Bajos; CN = China; RU = Rusia; MX = México; CZ = República Checa.

6.6 Identificación de Genes de Virulencia y Detección de Polimorfismos

6.6.1 Plásmidos

Para la identificación de genes se realizaron las anotaciones de cromosoma y de los plásmidos por separado. Con el objetivo de confirmar la identidad de los plásmidos en los genomas completos, se realizó la identificación de genes asociados a la función de plásmidos utilizando los genes previamente reportados (Méndez *et al.*, 2020; Oh *et al.*, 2022). En el plásmido pCMS1-1 de la cepa CMS1 se encontró el gen *repA* que codifica para una proteína de replicación y un gen que codifica para una resolvasa (CMS1_00250), en pCMS1-2 se identificaron los genes que codifican

para una resolvasa, una relaxasa, una integrasa y el gen *parB*. Finalmente, en la cepa CMS2, en el plásmido pCMS2-1 se identificó *repA*, una resolvasa y una integrasa, y en pCMS2-2 se identificaron genes que codifican para una relaxasa, integrasa y el gen *parB*.

La presencia de estos genes sugiere que los contigs obtenidos son plásmidos, ya que los plásmidos grandes (alrededor de 30 kb), como en el caso de los plásmidos de *C. michiganensis*, cuentan con sistemas de partición activa, que están conformado por tres elementos: NTPasa (*parA/parM/tubZ*), proteína de interacción con ADN (*parB/parR/tubR*) y proteína de unión al centrómero del plásmido (*parS/parC*). Estos sistemas de partición aseguran que los plásmidos se repartan equitativamente en la descendencia al ser replicados (Alvarado, 2016). Por otro lado, el gen *repA* codifica para la proteína iniciadora de la replicación de plásmidos, regulando el número de copias de éstos (Uniprot Consortium, 2023). En el proceso de conjugación, la relaxasa se encarga de conocer el sitio *oriT* de los plásmidos, para hacer un corte en el enlace fosfodiéster, donde se una al extremo 5' para dejar libre el extremo 3' que servirá como cebador para una replicación en círculo rodante, mismo corte que “relaja” el superenrollamiento (Draper *et al.*, 2005; Guasch *et al.*, 2003; Llosa *et al.*, 1995, 2002). Las resolvasas se encargan de resolver secuencias tándem formadas por los plásmidos al sufrir recombinación homóloga o replicarse, que pueden provocar errores en la segregación de estos durante la replicación celular (Rice, 2015).

La identificación de los genes de virulencia codificados en los plásmidos se muestra en el Cuadro 4. Para las cepas CMS1 y CMS2 se identificaron los genes *celA* y *ppaJ* en los plásmidos pCMS1-1 y pCMS2-1, respectivamente; esta localización es consistente con lo previamente identificado en el plásmido pCM1 de la cepa NCPPB 382. Por otro lado, los genes *phpA* y *phpB* solo se encontraron en la cepa CMS1 localizados en el plásmido pCMS1-1, lo cual es inusual ya que estos genes se han reportado generalmente en el plásmido pCM2. En el caso del gen *pat-1*, en la cepa CMS1 se identificó en el plásmido pCMS1-1, lo cual es inconsistente ya que este gen comúnmente se localiza en el plásmido pCM2. Interesantemente, un gen parecido a *pat-1* se identificó en el plásmido pCMS1-2. El análisis de alineamiento con el gen *pat-1* de la cepa de referencia reveló que el gen en su región inicial no fue homólogo a los primeros 72 nucleótidos del gen, pero posteriormente la secuencia fue altamente conservada, lo cual podría indicar que este gen *pat-1* se encuentre formando un tipo de quimera con un gen adyacente en su región inicial. Estos resultados indicaron que la localización de los diferentes genes de virulencia (*phpA*, *phpB* y *pat-1*) fue diferente a lo esperado con respecto a la cepa de referencia NCPPB 382, ya que en esta cepa los tres genes se

encuentran localizados en el plásmido pCM2.

Estos cambios en la localización entre plásmidos pueden suceder debido a la naturaleza conjugativa de los plásmidos de *C. michiganensis*, donde se ha observado en los genes *celA* y *pat-1* que se encuentran en la cepa de referencia NCPPB 382 en los plásmidos pCM1 y pCM2, respectivamente, en las cepas MSF322 y VL527, ambos genes se encuentran su equivalente a pCM2. En cambio, en la cepa OP3, estos se encuentran distribuidos de la misma forma que en NCPPB 382. En el caso del gen *ppaJ*, que está localizado en pCM1 de la cepa de referencia, se encuentra en los equivalentes a pCM2 de VL527, MSF322 y OP3 (Méndez *et al.*, 2020).

Para el caso de los genomas en calidad de borrador de las cepas CMM y CMP, se identificaron los genes *celA* y *ppaJ*, mientras que el gen *pat-1* solo se identificó en la cepa CMM; en el caso de estas cepas, no fue posible definir el plásmido en el cual se encuentran localizados dichos genes ya que solo se contó con el genoma en borrador constituido por contigs; a pesar de esta limitación, los genomas ensamblados de las cepas CMM y CMP permitieron identificar los genes de virulencia. Los genes *celA* y *ppaJ* presentaron porcentajes de identidad mayores a 99%, sin embargo, mostraron porcentajes de cobertura menores a 90% con respecto a la cepa de referencia (Marcados con rojo en el Cuadro 4).

Cuadro 4. Identificación de genes de virulencia en plásmidos de las cepas de *C. michiganensis* en estudio.

GEN	CEPA			
	CMM	CMP	CMS1	CMS2
	%ID/%COB	%ID %COB	% ID/%COB	% ID/%COB
<i>celA</i>	99.95/87.15	99.95/87.15	99.96/100	99.55/100
<i>ppaJ</i>	100/62.74	100/62.74	100/100	100/100
<i>pat-1</i>	97.36/98.93		100/63.35	97.16/75.19
<i>phpA</i>			100/100	
<i>phpB</i>			100/100	

* Formó un tipo de quimera en el extremo 5' del gen. Código de color: rojo, presente con baja cobertura (delección); blanco, ausencia; azul, presencia del gen en el plásmido 1; amarillo, presencia en el plásmido 2. Abreviaturas: %ID, identidad; %COB, cobertura. Estos valores se calcularon con ABRicate.

Tras el análisis de los genes se identificaron diferentes delecciones y polimorfismos mostrados en el cuadro 5, donde cabe resaltar que el gen *pat-1* de la cepa CMS2 no presentó homología en la

región 5' del gen, aunque la región restante presentó 100% identidad al gen sugiriendo una posible quimera por la posible fusión de *pat-1* con otro gen. (Cuadro 5).

Cuadro 5. Polimorfismos detectados en los genes de virulencia localizados en plásmidos de cepas de *C. michiganensis* analizadas en este estudio.

Gen	Cepa			
	CMM	CMP	CMS1	CMS2
<i>celA</i>	Delección inicial de 288 nt, 1 cambio de nt*	Delección inicial de 288 nt, 1 cambio de nt*	Inserción inicial 146 nt, inserción 4 nt, 1 cambio de nt	Inserción inicial de 182 nt, inserción de 4 nt, 9 cambios de nt
<i>ppaJ</i>	Delección inicial de 351 nt*	Delección inicial de 351 nt*	Inserción inicial de 45 nt*	Inserción inicial de 45 nt*
<i>pat-1</i>	Delección inicial de 9 nt, cambio de 22 nt		Delección inicial de 309 nt* Delección inicial de 210 nt, cambios de 15 nt*	Quimera en la región 5' inicial del gen*
<i>phpA</i>	---	---	Inserción inicial de 66 nt*	---
<i>phpB</i>	---	---	ND	---

ND, sin polimorfismos detectados con la cepa de referencia NCPPB 382. Abreviación: nt, nucleótido. *La secuencia resultante en aminoácidos del gen con polimorfismos no se ha reportado en otras cepas en las bases de datos del NCBI.

Una vez obtenidos los diferentes polimorfismos, se realizó una búsqueda de proteínas idénticas en bases de datos del NCBI utilizando la secuencia de aminoácidos resultante de los genes de virulencia con polimorfismos identificados en cada cepa. Esto se realizó con el objetivo de determinar si los polimorfismos encontrados a nivel de nucleótido generaron cambios a nivel de proteína, y si estos cambios se han reportado con anterioridad en otras cepas o si son completamente nuevos. Interesantemente, en algunos genes donde a nivel de secuencia se detectaron delecciones o inserciones y la anotación arrojó que los genes no iniciaron con el codón ATG (metionina) sino con otros alternativos, se observó que, al realizar el análisis de proteínas idénticas de dichos genes ya traducidos a secuencia de proteínas, en algunos no se encontró diferencia incluso con la cepa NCPPB 382, y esto se explica porque esta región inicial previa al ATG es una región que no se traduce. Este fenómeno se observó en algunos genes de plásmidos (ejemplo *celA*) así como en el cromosoma y la PAI. De manera general, el análisis de cada gen de virulencia en plásmidos reveló que varias proteínas resultantes de los genes con polimorfismos de las cepas en estudio no se han

reportado previamente en las bases de datos (indicadas por * en Cuadro 5). Para el gen *celA*, la proteína resultante en la cepa CMS1 no presentó cambios y se ha encontrado en 4 cepas, incluyendo a la de referencia, donde dos de estas fueron aisladas en México; para la cepa CMS2 se ha registrado en 7 cepas aisladas en Chile, Israel e Irán, y en las cepas CMM y CMP no se han encontrado y dan lugar a proteínas más cortas que la de referencia. Las deleciones e inserciones identificadas en el gen *ppaJ* no se encontraron reportadas. Unicamente, se encontraron registradas las proteínas resultantes de los polimorfismos para *pat-1* en la cepa CMM en 23 cepas, algunas de estas reportadas como aisladas en México. La proteína resultante de la inserción inicial en el gen *phpA* de la cepa CMS1 no se encontró reportado.

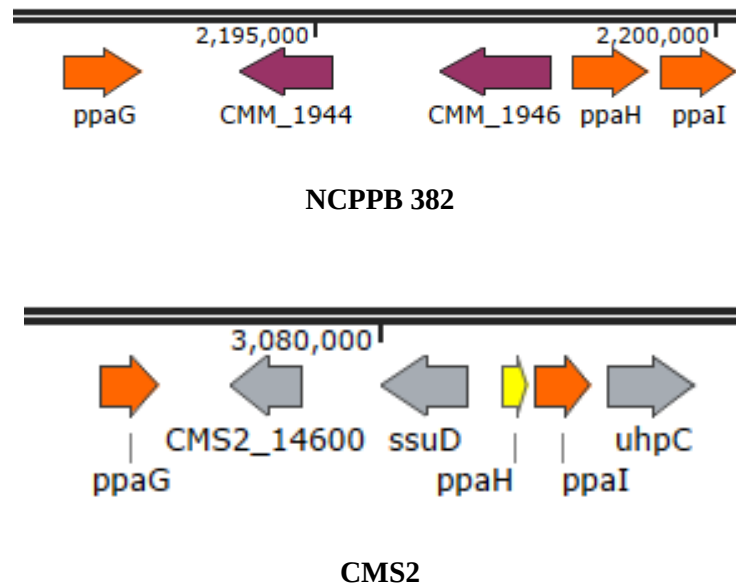
6.6.2 Cromosoma Bacteriano

La identificación de los genes de virulencia en regiones cromosómicas fuera de la PAI mostró que las cuatro cepas en estudio no variaron en cuanto a su perfil de presencia/ausencia, a excepción de la cepa CMM, donde no se identificó el gen *pgaA*. El gen *ppaF* en la cepa CMM y el gen *ppaH* en CMM, CMP y CMS1 presentaron un porcentaje de identidad mayor a 99%, pero mostraron porcentajes de cobertura muy bajos (12.5% para *ppaF* y 44.41% para *ppaH*) con respecto a la cepa de referencia (marcados en rojo en el Cuadro 6). El análisis por alineamiento de los genes *ppaF* y *ppaH* de las cepas en estudio con los genes correspondientes de la cepa de referencia NCPPB 382 mostró que estos presentaron una alta identidad en regiones específicas con los genes del genoma de referencia, lo cual sugiere deleciones y otros polimorfismos en el gen. En el caso del gen *ppaH*, se comparó la posición del gen de la cepa CMS2 con respecto a genes adyacentes tomando como patrón al genoma de referencia. Este análisis mostró que el gen *ppaH* conservó la organización estructural con genes adyacentes (Figura 12), con lo cual se decidió considerar los genes *ppaH* con deleciones como los ortólogos en las cepas correspondientes. En el caso del gen *ppaF*, se decidió considerar como un gen con una deleción en la cepa CMM. Los polimorfismos identificados en todos los genes se muestran en el Cuadro 7, incluyendo en su mayoría cambios de nucleótido y en menor medida otras deleciones.

Cuadro 6. Identificación de genes en otras regiones del cromosoma.

GEN	Cepa			
	CMM %ID/%COB	CMP %ID/%COB	CMS1 %ID/%COB	CMS2 %ID/%COB
<i>ppaF</i>	100/12.5	99.39/100	99.29/100	99.29/100
<i>ppaG</i>	99.78/89.22	99.8/100	99.9/100	99.8/100
<i>ppaH</i>	99.77/44.41	99.77/44.41	99.5/100	100/44.41
<i>ppaI</i>	99.69/100	99.69/100	99.79/100	100/100
<i>xysA</i>	99.46/85.19	99.54/100	99.31/100	99.38/100
<i>xysB</i>	99.82/84.33	99.85/100	99.85/100	99.85/100
<i>pgaA</i>		99.8/100	99.93/100	99.93/100
<i>endX</i>	100/100	100/100	99.5/100	100/100
<i>endY</i>	99/99.15	99/99.15	99.28/99.15	98.78/99.15
<i>expA</i>	99.61/100	99.61/100	99.34/100	98.56/98.82
<i>perF</i>	99.72/100	99.72/100	99.36/100	99.72/100
<i>srtA</i>	99.88/100	99.88/100	99.88/100	99.88/100
<i>vatr1</i>	98.4/100	98.4/100	98.24/100	98.4/100
<i>vatr2</i>	99.77/100	99.77/100	99.7/100	99.62/100
<i>sbtB</i>	99.64/98.13	99.64/98.13	99.72/98.13	99.7/98.13
<i>sbtC</i>	99.64/100	99.64/100	99.72/100	99.61/100

Código de color: rojo, presente con baja cobertura (delección); blanco, ausencia; naranja, presencia. Abreviaturas: %ID., identidad; %COB, cobertura. Estos valores se calcularon con ABRicate.

**Figura 12.** Organización estructural de los genes adyacentes al gen *ppaH* de la cepa CMS2 en comparación con la cepa de referencia NCPPB 382.

Cuadro 7. Polimorfismos detectados en los genes de virulencia localizados en regiones del cromosoma que excluyen la PAI. Abreviación: nt, nucleótido.

CEPA				
GEN	CMM	CMP	CMS1	CMS2
<i>ppaF</i>	Delección inicial de 861 nt*	Cambio de 6 nt*	Cambio de 7 nt	Cambio de 8 nt
<i>ppaG</i>	Delección inicial de 108 nt, cambio de 2 nt*	Cambio de 2 nt	Cambio de 1 nt	Cambio de 2 nt
<i>ppaH</i>	Delección inicial de 552 nt y cambio de 1 nt*	Delección inicial de 552 nt y cambio de 1 nt*	Cambio de 4 nt	Delección inicial de 552 nt y cambio de 1 nt*
<i>ppaI</i>	Cambio de 3 nt	Cambio de 3 nt	Cambio de 2 nt	ND
<i>xysA</i>	Delección inicial de 192 nt, cambio de 6 nt*	Cambio de 6 nt	Cambio de 9 nt	Cambio de 8 nt*
<i>xysB</i>	Delección inicial de 315 nt, cambio en 3 nt*	Cambio de 3 nt	Cambio de 3 nt	Cambio de 3 nt
<i>pgaA</i>		Cambio de 3 nt	Cambio de 1 nt	Cambio de 1 nt
<i>endX</i>	ND	ND	Cambio de 1 nt	ND
<i>endY</i>	Delección de 12 nt a partir del nt 443, cambio de 13 nt	Delección de 12 nt a partir del nt 443, cambio de 14 nt	Delección de 12 nt a partir del nt 443, cambio de 10 nt	Delección de 12 nt a partir del nt 443, cambio de 16 nt
<i>expA</i>	Cambio de 3 nt	Cambio de 3 nt	Cambio de 5 nt	Cambio de 9 nt, inserción final de 3 nt
<i>perF</i>	Cambio de 4 nt	Cambio de 4 nt	Cambio de 7 nt	Cambio de 4 nt
<i>srtA</i>	Cambio de 1 nt	Cambio de 1 nt	Cambio de 1 nt	Cambio de 1 nt
<i>vatr1</i>	Cambio de 10 nt	Cambio de 10 nt	Cambio de 11 nt	Cambio de 10 nt
<i>vatr2</i>	Cambio de 3 nt	Cambio de 3 nt	Cambio de 4 nt	Cambio de 5 nt
<i>sbtB</i>	Delección inicial de 69 nt, cambio de 14 nt	Delección inicial de 69 nt, cambio de 14 nt	Delección inicial de 69 nt, cambio de 11 nt	Delección inicial de 69 nt, cambio de 10 nt*
<i>sbtC</i>	Cambio de 13 nt	Cambio de 12 nt	Cambio de 10 nt	Cambio de 14 nt

ND, no detectado

*La secuencia resultante en aminoácidos del gen con polimorfismos no se ha reportado en otras cepas en las bases de datos del NCBI.

La búsqueda de proteínas idénticas en bases de datos mostró que los polimorfismos resultaron en proteínas hipotéticas no reportadas principalmente en la cepa CMM. Para el gen *ppaF*, lo encontrado para la cepa CMS1 se ha identificado previamente en 36 cepas de diferentes orígenes geográficos incluidos México, Chile, China, Israel y EE. UU., para CMS2 se encontraron 9 cepas de Chile y EE. UU., a diferencia de CMM y CMP donde no se han reportado las proteínas resultantes de los polimorfismos. Para el caso del gen *ppaG*, se encontró que aun cuando sus

polimorfismos son el cambio de 2 y un nucleótido, las cepas CMP, CMS1 y CMS2 tienen el mismo producto de proteína mismo que se ha registrado en 108 cepas de diferentes países, en cambio, el de la cepa CMM es nuevo. Los cambios de nucleótidos encontrados en el gen *ppaH* en la cepa CMS1 se encontraron en 14 cepas de diferentes orígenes, incluyendo México, sin embargo, la delección y cambios encontrados en las cepas CMS2, CMP y CMM no se encontraron en ninguna proteína de otras cepas. Para el gen *ppaI*, los polimorfismos encontrados en CMM y CMP, se han registrado en 13 cepas de diferentes países, los encontrados en la cepa CMS1 se han reportado en 84 cepas. La proteína traducida para el gen *xysA* en las cepas CMM y CMS1 se ha identificado en 25 y 7 cepas, respectivamente; en el caso del gen *xysB*, las proteínas resultantes de los cambios de nucleótido encontrados en las cepas CMS1, CMS2 y CMP se encontraron en 15 cepas de diferentes orígenes geográficos, mientras que, la delección y polimorfismos encontrados en CMM no se ha asociado a alguna proteína previamente. Las cepas CMS1, CMS2 y CMP presentaron cambios de nucleótidos en el gen *pgaA*, sin embargo, su producto de proteína resultó ser idéntico entre ellas y otras 75 cepas reportadas en base de datos, incluyendo a la de referencia. El cambio de un nucleótido de la cepa CMS1 del gen *endX* produce una proteína previamente identificada en 16 cepas de diferentes orígenes geográficos. Las cepas CMM y CMP presentaron la misma delección y cambios nucleótidos, respectivamente en el gen *endY*, mismo que resultaron en una proteína que se ha reportado en una cepa, lo encontrado en la cepa CMS1 se ha encontrado para 4 y para CMS2 en una de Israel. Para el gen *expA* se encontró el mismo polimorfismo en las cepas CMM y CMP que se traducen en una proteína que también se ha registrado en otras 10 cepas, para la cepa CMS1 se encontró en 49 cepas y en CMS2 en 4 cepas. El polimorfismo encontrado para el gen *perF* en las cepas CMS2, CMP y CMM se encontró previamente en 52 cepas, cuando, el cambio en la secuencia de la cepa CMS1 se ha reportado en 7. Las 4 cepas presentaron en la secuencia del gen *srtA* un cambio de nucleótido que no afectó la secuencia de la proteína que se ha encontrado en 106 cepas, incluyendo a la de referencia. Los polimorfismos detectados en todas las cepas para los genes de ambos reguladores transcripcionales (*vatr1* y *vatr2*) y el gen *sbtC* se han identificado previamente. Finalmente, la proteína traducida a partir de la delección y los cambios de nucleótido en el gen *sbtB* en las cepas CMS1, CMM y CMP se encontró en 34 cepas y para la cepa CMS2 se identificó como no reportado previamente.

6.6.3 Isla de Patogenicidad (PAI)

La detección de los 17 genes de virulencia que forman parte de la PAI mostraron diferencias en cuanto al perfil en las diferentes cepas (Cuadro 8). Los genes *chpA* y *chpD* que son pseudogenes no se encontraron en ninguna de las cuatro cepas. La cepa CMM fue la que presentó el menor número de genes de virulencia ya que solo se identificaron 10 de los 17 genes, mientras que, en la cepa CMP se detectaron 15 de 17 genes de virulencia. En las cepas de Sinaloa (CMS1 y CMS2), se detectaron 13 y 14 de los 17 genes de virulencia en CMS1 y CMS2, respectivamente (Cuadro 8).

La presencia/ausencia de los genes se muestra en el cuadro 8, donde se encontraron algunos genes con bajos porcentajes de cobertura, los cuales se analizaron encontrándose diferentes polimorfismos que explican estos resultados (Cuadro 9).

Cuadro 8. Identificación de genes de virulencia en la isla de patogenicidad.

GEN	Cepa			
	CMM %ID/%COB	CMP %ID/%COB	CMS1 %ID/%COB	CMS2 %ID/%COB
<i>chpA</i> *				
<i>chpB</i> *	99.65/99.42	99.65/99.42		99.77/99.42
<i>chpC</i>	80.2/93.84	99.88/100	99.88/100	99.88/100
<i>chpD</i> *				
<i>chpE</i>	98.68/100	98.68/100	98.8/100	100/100
<i>chpF</i>		99.77/100	99.88/100	99.77/100
<i>chpG</i>		100/89.57	100/89.57	100/89.57
<i>ppaA</i>	99.59/100	99.59/100	99.59/100	99.49/100
<i>ppaB1</i>		99.72/35.22	99.5/100	99.6/100
<i>ppaB2</i>		99.43/35.03	98.9/100	98.9/100
<i>ppaC</i>	99.75/77.51	99.75/77.51	99.75/77.51	99.75/77.51
<i>ppaD</i>	99.9/100	99.9/100	99.9/100	99.9/100
<i>ppaE</i>	99.69/100	99.69/100	99.79/100	99.69/100
<i>sbtA</i>	99.68/100	99.68/100	99.83/97.29	99.65/100
<i>pelA1</i>	99.17/28.17	97.55/62.32	97.36/62.32	97.55/62.32
<i>pelA2</i>		96.8/62.32	97.18/62.32	97.18/62.32
<i>tomA</i>	99.69/100	99.69/100	99.69/100	99.63/100

Código de color: rojo, presente con baja cobertura (delección); blanco, ausencia; naranja, presencia. El asterisco (*) indica que es un pseudogén. Abreviaturas: %ID, identidad; %COB, cobertura. Estos valores se calcularon con ABRicate.

Cuadro 9. Polimorfismos detectados en genes localizados en la isla de patogenicidad.

GEN	Cepa			
	CMM	CMP	CMS1	CMS2
<i>chpB</i>	Inserción inicial de 304 nt, delección de 5 nt, cambio de 3 nt	Inserción inicial de 304 nt, delección de 5 nt, cambio de 3 nt		Inserción inicial de 303 nt*
<i>chpC</i>	Delección inicial de 48 nt, gran cantidad de cambios de nt	Cambio de 1 nt	Cambio de 1 nt	Cambio de 1 nt
<i>chpE</i>	Cambio de 10 nt	Cambio de 10 nt	Cambio de 9 nt	ND
<i>chpF</i>		Cambio de 2 nt	Cambio de 1 nt	Cambio de 2 nt
<i>chpG</i>		Delección inicial de 27 nt	Delección inicial de 87 nt	Delección inicial de 87 nt
<i>ppaA</i>	Cambio de 4 nt*	Cambio de 4 nt*	Cambio de 4 nt*	Cambio de 5 nt
<i>ppaB1</i>		Delección inicial de 651 nt, cambio de 1 nt*	Cambio de 5 nt	Cambio de 4 nt
<i>ppaB2</i>		Delección inicial de 651 nt, cambio de 2 nt*	Cambio de 11 nt	Cambio de 11 nt
<i>ppaC</i>	Delección inicial de 228 nt, 2 cambios de nt	Delección inicial de 228 nt, 2 cambios de nt	Delección inicial de 228 nt, 2 cambios de nt	Delección inicial de 228 nt, 2 cambios de nt
<i>ppaD</i>	Cambio de 1 nt	Cambio de 1 nt	Cambio de 1 nt	Cambio de 1 nt
<i>ppaE</i>	Cambio de 3 nt*	Cambio de 3 nt*	Cambio de 2 nt	Cambio de 3 nt*
<i>sbtA</i>	Cambio de 10 nt*	Cambio de 10 nt*	Delección inicial de 84 nt, cambio de 4 nt	Cambio de 11 nt
<i>pelA1</i>	Delección de 612 nt al inicio del gen, 2 cambios de nt*	Delección de 321 nt al inicio del gen, 13 cambios de nt	Delección de 321 nt al inicio del gen, 12 cambios de nt	Delección de 321 nt al inicio del gen, 13 cambios de nt
<i>pelA2</i>		Delección inicial de 321 nt, cambio de 17 nt	Delección inicial de 321 nt, 15 cambios de nt*	Delección inicial de 321 nt, 15 cambios de nt
<i>tomA</i>	Cambio de 5 nt	Cambio de 5 nt	Cambio de 5 nt	Cambio de 6 nt*

Código de color: rojo, presente con baja cobertura (delección); blanco, ausencia; naranja, presencia. El asterisco (*) indica que es un pseudogén. Abreviaturas: %ID, identidad; %COB, cobertura. Estos valores se calcularon con ABRicate.

Aunado a los alineamientos, se analizó la organización de los genes identificados de la PAI en las cepas CMS1 y CMS2 comparando con la cepa de referencia NCPBB 382 y se pudo identificar que el orden coincidió con la estructura de la cepa de referencia, lo cual confirmó la identidad de los genes de virulencia, en especial aquellos identificados con grandes delecciones (resaltados en amarillo) (Fig. 13).

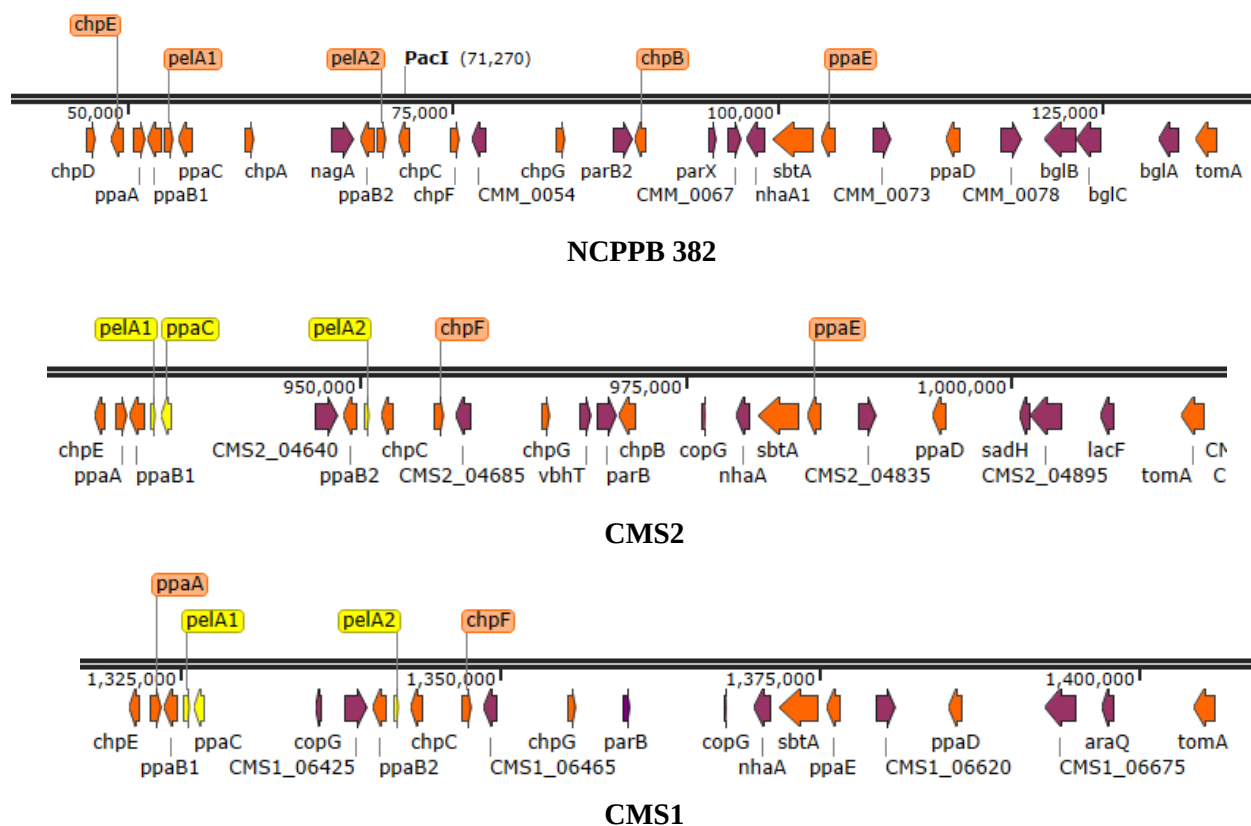


Figura 13. Representación esquemática de las islas de patogenicidad (PAI) de las cepas CMS1 y CMS2 de *C. michiganensis*. Genes de virulencia resaltados en naranja; genes de virulencia con bajo porcentaje de cobertura resaltados en amarillo.

En cuanto a la búsqueda de proteínas idénticas, el gen *ppaC*, que presentó en las cuatro cepas el mismo porcentaje de cobertura (77.51%) e identidad (99.75%), la proteína resultante se identificó en siete cepas aisladas en México y una cepa de Israel. La misma situación se presentó en el gen *ppaD* donde hubo un cambio de un nucleótido, el cual no afectó la secuencia de la proteína ya que se reportó en 61 cepas de diferentes orígenes geográficos. Las deleciones y cambios de nucleótidos detectados en el pseudogén *chpB* en las cepas CMM y CMP se encontraron también en otras tres cepas, mientras que, la deleción en la cepa CMS2 no se encontró asociada a ninguna proteína en la base de datos. Para el gen *chpC*, el cambio de un nucleótido identificado en las cepas CMS1, CMS2 y CMP no afectó la secuencia de la proteína ya que se encontró en otras 24 cepas, donde se incluye a la de referencia, entretanto, la proteína resultante de los polimorfismos en la cepa CMM se reportó para otras 3 cepas.

A pesar de los diferentes polimorfismos detectados en la secuencia del gen *chpE*, las cepas CMS1, CMP y CMM codifican una proteína putativa idéntica, la cual se detectó en otras 11 cepas

reportadas. Para el gen *chpF*, los polimorfismos de las cepas CMS1, CMS2 y CMP se encontraron en proteínas de 70 cepas incluyendo a la de referencia. En el caso del gen *chpG*, la proteína putativa con una delección inicial encontrada en las cepas CMS1 y CMS2 se encontró en 103 cepas y la correspondiente a la delección encontrada en la cepa CMP se encontró en 162 cepas, en ambos casos se incluía a la de referencia indicando que ninguna de estas dos delecciones afectó al producto de proteína con respecto a la de referencia. En caso del gen *ppaA*, las proteínas asociadas a los polimorfismos en las cepas CMS1, CMM y CMP, no se encontraron en bases de datos, en tanto que el cambio de nt en la cepa CMS2 se encontró en una cepa de Israel. En el gen *ppaB1*, los cambios de nucleótidos encontrados en la cepa CMS1 y CMS2 se han reportado previamente para 21 cepas, pero la proteína resultante de la delección encontrada en la cepa CMP no se encontró reportada.

El gen *ppaB2* de la cepa CMP no se encontró reportada, por otro lado, el cambio de nt's encontrado en CMS1 y CMS2 se encontró en 37 cepas. Para el gen *ppaE*, los polimorfismos en la cepa CMS1 se ha encontrado en 6 cepas, entretanto, en las cepas restantes no se ha identificado previamente. Los cambios de nucleótidos identificados en las cepas CMS1 y CMS2 en el gen *sbtA* se han encontrado previamente, a diferencia de lo encontrado en las cepas CMM y CMP es nuevo.

En el gen *pelA1* presentó diferentes polimorfismos en las cepas CMS1, CMS2 y CMP, aun cuando los cambios de nt no son idénticos su proteína es idéntica y se ha registrado previamente para otras 4 cepas. En el caso de la cepa CMM, los cambios asociados a los polimorfismos no se encontraron reportados en otras cepas.

En el gen *pelA2*, las proteínas producto de los polimorfismos detectados para la cepa CMS2 se encontraron para 6 cepas y para CMP se encontraron en otras 6 cepas de EE. UU., mientras que, el polimorfismo en la cepa CMS1 no se encontró en ninguna cepa. Finalmente, para el gen *tomA* las proteínas asociadas a los polimorfismos en las cepas CMS1, CMM y CMP se encontraron en 34 cepas, entretanto, en la cepa CMS2 no se encontró reportado previamente.

6.6.4 Perfil General del Contenido de Genes de Virulencia

El perfil completo que consideró los 38 genes de virulencia de cada una de las cepas evaluadas en este estudio mostró que la cepa CMS1 presentó 35 genes, de los cuales el gen *pat-1* se

identificaron 2 copias, una en cada plásmido, por lo que si se considera serían un total de 36 genes. La cepa CMS2 presentó 34 de los 38 genes, mientras que, las cepas CMM y CMP mostraron un total de 28 y 33 genes de virulencia, respectivamente. A pesar del contenido de genes, se pudo observar que no existió una correlación entre la virulencia observada en plantas de tomate (sección 6.2) con el perfil de genes de virulencia de cada cepa. El ANOVA del factor cepa reveló que la cepa CMM resultó ser la menos virulenta que CMS1, mientras que, entre las demás cepas no hubo una diferencia significativa; esta cepa en particular fue la que presentó una menor cantidad de genes, no obstante, no resultó ser diferente de CMS2 ni CMP, con 34 y 33 genes, respectivamente (Cuadro 10). En el caso de las cepas CMS1 y CMS2, éstas presentaron el contenido más alto de genes, aunque no resultaron ser significativamente las más virulentas en general, aunque en el caso de los cultivares Aguamiel e Itzafort si presentaron la mayor virulencia comparadas con las otras cepas. Estos resultados en conjunto con el análisis estadístico de la severidad de la enfermedad en los diferentes genotipos de tomate, sugiere que si bien el contenido de genes de virulencia es importante no predice la virulencia de la cepa *per se*, ya que otros factores, posiblemente algunos asociados a la planta como factores de sensibilidad y resistencia, influyen en la severidad de la enfermedad. Asimismo, no es posible descartar que los diferentes polimorfismos encontrados en cada uno de los genes de virulencia en cada cepa pudieron afectar la función del gen y con ello la capacidad de infección y virulencia. Finalmente, estos resultados también sugieren la presencia de genes asociados a la virulencia, adicionales a los ya reportados, los cuales podrían contribuir de manera diferencial con la aparición de síntomas en plantas de tomate.

Cuadro 10. Resumen del contenido de genes de virulencia de las cuatro cepas de *C. michiganensis* en estudio.

Localización	CMM	CMP	CMS1	CMS2
Plásmidos (5)	3	2	5 ^a	3
Cromosoma (16)	15	16	16	16
PAI (17)	10	15	14	15
Total	28	33	35	34
Genes con delecciones	13	11	9	8
Total genes sin delecciones	15	22	26	26

^aSe consideró el gen *pat-1* como uno, aunque de este gen hubo dos copias, uno en cada plásmido. Si se considera la copia sería un total de 36 genes.

Es importante destacar que, el análisis de proteínas idénticas permitió detectar que algunos polimorfismos aunque implicaron cambios en la secuencia de nucleótidos, no afectaron la secuencia de las proteínas, y además validó algunos de los polimorfismos detectados en las cuatro cepas en estudio al encontrar coincidencias con otras cepas en las bases de datos. Por otro lado, este análisis también reveló variantes en las proteínas que anteriormente no se han reportado en ninguna cepa en bases de datos. En este caso, se encontraron proteínas putativas nuevas en 19 genes del total de 38 genes analizados, distribuidos entre las diferentes cepas, donde se puede observar que la cepa con mayor cantidad de genes con deleciones es CMM. Sin embargo, conforme a lo obtenido en el ensayo de virulencia se puede observar que CMM en el cultivar Heinz 1015, numéricamente obtuvo el valor más alto aun cuando no difirió significativamente de los demás (Fig. 6B). También se observó que esta cepa no fue significativamente diferente de CMS2 en el cv. Aguamiel, la cual causó el valor más alto (Fig. 6C). Lo mismo se observó en el portainjerto Multifort donde no es significativamente diferente de CMP (Fig. 7A). Sin embargo, puede observarse que, para el caso de Itzafort, la cepa que presentó los valores más bajos fue CMM, mostrando la gran importancia de la virulencia de la cepa en relación con el genotipo del hospedante.

En total, se encontraron 24 variantes de proteínas no reportadas previamente, de los cuales 14 se generaron de genes con deleciones mayores a 100 nt, 2 variantes de genes con deleciones menores a 100 nt (69 y 45 nt), una variante a partir de una inserción y 7 fueron cambios de nt (variando de 2-10 nt). Se ha mencionado el rol esencial del gen *celA* en la virulencia de las cepas de *C. michiganensis* previamente caracterizadas, en el caso de las cepas de este estudio se encontró para CMS1 y CMS2 inserciones aunque a nivel de proteína no hubo cambios para CMS1, mientras que, en CMS2 si cambió la secuencia, pero ambas se encontraron reportadas en otras cepas; y para las cepas CMM y CMP se encontró una deleción inicial de 288 nt que resultó en una proteína trunca, que no se encontró reportada para alguna variante de proteína. Por otro lado, en el caso de *pat-1* se encontraron deleciones en las cepas que lo contienen, aunque en CMP que careció de este gen, mostró los valores más altos de severidad de la enfermedad en el portainjerto Multifort y no fue la de valores más bajos en ningún genotipo evaluado, reiterando que este gen no tiene un papel tan importante en la virulencia (Malliarakis *et al.*, 2023)

6.7 Detección de Genes de Resistencia a Antibióticos.

Al realizar la búsqueda de genes de resistencia a antibióticos utilizando la base de datos CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database), no se detectó ninguno gen de resistencia a antibióticos en los genomas de las cepas de Morelos (CMM) y Puebla (CMP). Sin embargo, para las cepas de Sinaloa (CMS1 y CMS2), se detectó que poseen un polimorfismo en un solo nucleótido (K43R) en el gen *rpsL*, lo cual puede conferir resistencia a estreptomicina, consistente con lo encontrado para la cepa OP3 aislada de Chile (Méndez *et al.*, 2020; Valenzuela *et al.*, 2021). Esta mutación pudo seleccionarse debido al uso de estreptomicina, ya sea aplicándola sola o mezclada con cobre en intentos para controlar este patógeno; sin embargo, el uso continuo de este antibiótico, reportado por décadas en Chile ha ocasionado que se reporte resistencia por parte de varias bacterias patógenas (Méndez *et al.*, 2020; Valenzuela *et al.*, 2021).

6.8 Análisis de Pangenomas

Al analizar las cuatro cepas (CMM, CMP, CMS1 y CMS2) en conjunto con la de referencia NCPPB 382 se identificaron 3,364 clusters (Fig.14) de genes, mismos que fueron agrupados en tres “bins”, uno para el genoma núcleo (core genome), donde se encontraron 2,629 clusters con 13,817 genes; otro para el genoma accesorio, donde se encontraron 568 clusters con 1,984 genes y se encontraron 167 genes únicos (cada gen se contó como un cluster). De estos 167 genes únicos, 48 corresponden a CMS1, 26 a CMS2, 20 a CMM y los 73 restantes corresponden a la cepa NCPPB 382. La cepa CMS1 presentó la mayor cantidad de genes únicos, mientras que, la cepa CMP no presentó genes únicos. Estos resultados son consistentes con lo reportado previamente por Méndez *et al.* (2020), donde el número de genes únicos en cepas Chilenas varió de 43 a 91 genes, siendo este el único reporte de pangenomas en *C. michiganensis*. No obstante, el número de genes únicos en *C. michiganensis* es bajo, ya que en otros trabajos en *Ralstonia solanacearum* se encontraron 2724 genes únicos (Geng *et al.*, 2022) y en *Vibrio parahaemolyticus* hasta 2739 genes únicos (González-Gómez *et al.*, 2020)

En el caso de CMS1, se encontraron genes con funciones asociadas a recombinasas, helicasas, ATPasas, reguladores transcripcionales, helicasas, bacteriorodopsinas; sin embargo, resultó de interés la presencia de dos serinas proteasas de la familia de subtilisinas (15844 y 15870), como es el caso de algunas familias a las que pertenecen genes de virulencia como la *chp* y *ppa*. Para la cepa CMS2 se encontraron genes asociados a la glicólisis y uno a un factor transcripcional.

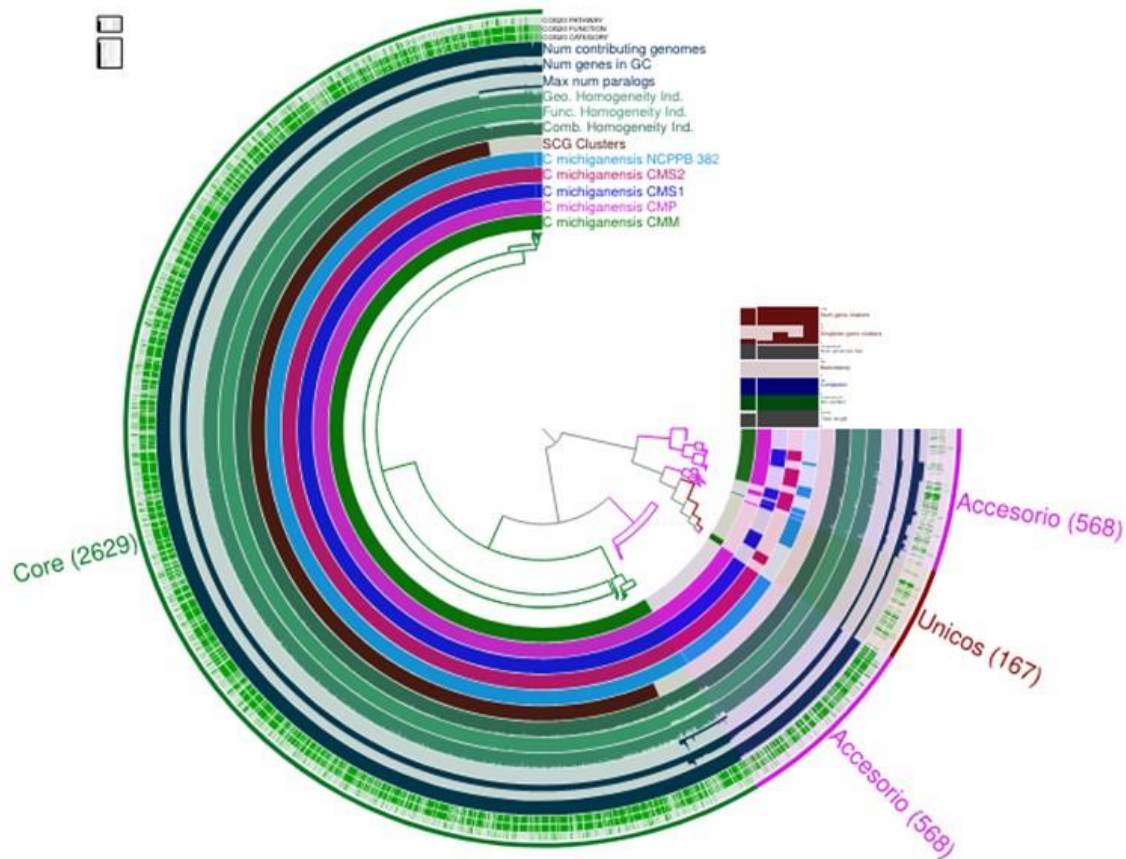


Figura 14. Análisis de pangenomas de CMS1, CMS2, CMM, CMP y NCPPB 382. El árbol se encuentra ordenado por frecuencias y la visualización esta por ausencia y presencia de cluster de genes. El número de clusters de genes de cada categoría está indicada entre paréntesis. El genoma accesorio son 568 clusters en total.

7. CONCLUSIONES

Conforme al ensayo de virulencia se hizo evidente la importancia del genotipo del hospedante para determinar la capacidad de las cepas de *C. michiganensis* para producir síntomas de la enfermedad, al encontrarse que la virulencia de las cepas fue diferencial y dependió de los diferentes genotipos de tomate evaluados, por lo que es posible que factores de respuesta a la enfermedad contenidos en estos genotipos podrían estar participando en la virulencia diferencial observada.

Al analizar los perfiles genéticos de las cuatro cepas se observó que no existe una correlación entre el número de genes de virulencia presentes y la virulencia de las cepas, puesto que la cepa con menor cantidad de genes de virulencia y mayor cantidad de genes deletados logró presentar los valores más altos de severidad de la enfermedad en uno de los genotipos evaluados.

Por otro lado, el análisis de polimorfismos en los diferentes genes de virulencia no presentó una tendencia hacia un tipo particular de polimorfismo, sino que fueron muy variados; sin embargo, dado que no se conoce el impacto de dichos polimorfismos en la funcionalidad de la proteína, es posible que estas diferencias pudieran estar abonando a la virulencia diferencial presentada por las cepas.

En cuanto a los pangenomas, se observó que la cantidad de genes únicos en las cepas de *C. michiganensis* de este estudio es relativamente baja, y en el caso de genes accesorios también el contenido es relativamente bajo; sin embargo, en algunas cepas cabe la posibilidad que la virulencia diferencial de las cepas puede estar dada por alguno de los genes únicos o accesorios que pudieran ser algún factor de virulencia clave que no ha sido reportado.

8. RECOMENDACIONES

Los resultados obtenidos de este estudio claramente indican que el grado de virulencia de las cepas de *C. michiganensis* y la severidad de los síntomas en las plantas de tomate no dependen solo del contenido de los genes de virulencia identificados hasta el momento. Los resultados de este estudio indican una falta de conocimiento en el contexto de la función de los genes que participan en la interacción con el hospedante y de los genes del tomate que pudieran conferir sensibilidad o resistencia a *C. michiganensis*. De aquí, que los análisis transcriptómicos de las cepas diferenciales en algunos genotipos de tomate contribuirán a entender las diferencias en los perfiles de transcripción de la planta y de la cepa durante la interacción, proporcionando información valiosa de genes importantes en estos procesos.

Por otro lado, aún falta esclarecer la función de algunos de los genes de virulencia reportados y determinar si los polimorfismos detectados en estos genes podrían o no afectar la funcionalidad del gen y por ende la virulencia de la cepa. En este sentido, la evaluación de la funcionalidad de estos genes a través de la generación de cepas mutantes por ingeniería genética ayudaría a esclarecer si la función asociada a dicho gen es afectada por los polimorfismos detectados.

De igual manera, es posible que otros genes aún no reportados contribuyan en la virulencia y la interacción planta-patógeno, por lo que la identificación y caracterización de genes nuevos podrían contribuir a un entendimiento integral en el desarrollo de la enfermedad, lo cual es crítico para el desarrollo de cultivares de tomate resistentes.

9. REFERENCIAS

- Adams, S. (2001). Effect of temperature on the growth and development of tomato fruits. *Annals of Botany*, 88(5), 869–877. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1524>
- Alcock, B. P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K. W., Raphenya, A. R., Wlodarski, M. A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S. A., Tsang, K. K., Baker, S. J. C., Dave, M., McCarthy, M. C., Mukiri, K. M., Nasir, J. A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., McArthur, A. G. (2023). CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D690–D699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>
- Alvarado, A. (2016). Clasificación de plásmidos por relaxasas (tesis doctoral). Universidad de Cantabria. Santander, España.
- Álvaro, J., & Urrestarazu, M. (2011, April). Incidencia de los factores abióticos en la producción del tomate en invernadero. *Agricultura: Revista Agropecuaria*, 939, 270–273.
- Arizala, D., Dobhal, S., Alvarez, A. M., & Arif, M. (2022). Elevation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *californiensis* to species level as *Clavibacter californiensis* sp. nov., merging and reclassification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *chilensis* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *phaseoli* as *Clavibacter phaseoli* sp. nov. based on complete genome in silico analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 72(9). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005427>
- Arwiyanto, T., Sakata, K., Goto, M., Tsuyumu, S., & Takikawa, Y. (1994). Induction of tomatine in tomato plant by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathological Society of Japan*, 60(3).
- Ávila, R. E., Samar, M. E., Díaz-Beltrán, L., & Esteban, F. J. (2012). El genoma en los cordados: Introducción a la genómica comparada. *International Journal of Morphology*, 30(4), 1309–1315. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022012000400009>
- Barker, J. C. (1990). Effects of day and night humidity on yield and fruit quality of glasshouse tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Horticultural Science*, 65(3), 323–331. <https://doi.org/10.1080/00221589.1990.11516061>
- Basım, H., & Basım, E. (2018). Phenotypic and genotypic characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causing tomato bacterial canker and wilt disease in Turkey. *European Journal of Plant Pathology*, 151(2), 355–369. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1378-3>
- Basu, P. K. (1970). Temperature, an important factor determining survival of *Corynebacterium michiganense* in soil. *Phytopathology*, 60(5), 825. <https://doi.org/10.1094/Phyto-60-825>
- Baysal, Ö., Gürsoy, Y. Z., Örnek, H., & Duru, A. (2005). Induction of oxidants in tomato leaves treated with DL- β -Amino butyric acid (BABA) and infected with *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *European Journal of Plant Pathology*, 112(4), 361–369. <https://doi.org/10.1007/s10658-005-6234-1>

- Baysal, Ö., Soyly, E. M., & Soyly, S. (2003). Induction of defence-related enzymes and resistance by the plant activator acibenzolar-S-methyl in tomato seedlings against bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Plant Pathology*, 52(6), 747–753. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2003.00936.x>
- Bekircan Eski, D., & Darcan, C. (2023). Isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-specific bacteriophages from tomato fields in Turkey and their biocontrol potential. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 33(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-023-00717-9>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Borboa-Flores, J., Rueda-Puente, E., Acedo-Félix, E., Ponce, J., Cruz, M., Grimaldo-Juarez, O., & García-Ortega, Á. (2009). Detection of *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis* in tomato of the state of Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(4), 319–326. <https://www.researchgate.net/publication/286641742>
- Burger, A., Gräfen, I., Engemann, J., Niermann, E., Pieper, M., Kirchner, O., Gartemann, K.-H., & Eichenlaub, R. (2005). Identification of homologues to the pathogenicity factor Pat-1, a putative serine protease of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microbiological Research*, 160(4), 417–427. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2005.03.006>
- Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2017). Bacteriophages and bacterial plant diseases. In *Frontiers in Microbiology*, 8(34), 1–34. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00034>
- Cantarel, B. L., Coutinho, P. M., Rancurel, C., Bernard, T., Lombard, V., & Henrissat, B. (2009). The Carbohydrate-Active enZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research*, 37, D233–D238. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn663>
- Carlton, W. M., Braun, E. J., & Gleason, M. L. (1998). Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology*, 88(6), 525–529. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.6.525>
- Cellini, A., Donati, I., Fiorentini, L., Vandelle, E., Polverari, A., Venturi, V., Buriani, G., Vanneste, J. L., & Spinelli, F. (2020). N-Acyl homoserine lactones and lux solos regulate social behaviour and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Microbial Ecology*, 79(2), 383–396. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01416-5>
- Chalupowicz, L., Barash, I., Reuven, M., Dror, O., Sharabani, G., Gartemann, K., Eichenlaub, R., Sessa, G., & 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. <https://doi.org/10.1111/mpp.12400>
- Chalupowicz, L., Cohen-Kandli, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K. H., Sessa, G., Barash, I., & Manulis-Sasson, S. (2010). Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology*, 100(3), 252–261. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-3-0252>
- Chalupowicz, L., Zellermann, E.-M., Fluegel, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H.,

- Savior, A., Sessa, G., Iraki, N., Barash, I., & Manulis-Sasson, S. (2012). Colonization and movement of GFP-Labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology*, 102(1), 23–31. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-11-0135>
- Chang, R. J. (1991). Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology*, 81(10), 1276–1281. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-1276>
- Chemionics International, Inc. (2008). Programa de diversificación hortícola. Manejo de cultivo de tomate. 1-34
- Chirinos, D. T., Castro, R., Cun, J., Castro, J., Peñarrieta Bravo, S., Solis, L., & Geraud-Pouey, F. (2019). Los insecticidas y el control de plagas agrícolas: la magnitud de su uso en cultivos de algunas provincias de Ecuador: la magnitud de su uso en cultivos de algunas provincias de Ecuador. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 21(1), 1–16. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num1_art:1276
- Coil, D., Jospin, G., & Darling, A. E. (2015). A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics*, 31(4), 587–589. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu661>
- Cubero, J., Cuesta-Morondo, S., Sabuquillo, P., Hernández-Escribano, L., Redondo, C., & Martín, L. (2022). Bacteriología en el INIA/CSIC: utilidad de las técnicas ómicas para el control de enfermedades provocadas por bacterias en planta. *SEM@foro*, 73, 25–26. <https://doi.org/10.13039/501100011033>
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22(1), 39–44. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00095-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00095-9)
- Davis, M. J., Gillaspie, A. G., Vidaver, A. K., & Harris, R. W. (1984). *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(2), 107–117. <https://doi.org/10.1099/00207713-34-2-107>
- de León, L., Siverio, F., López, M. M., & Rodríguez, A. (2008). Comparative efficiency of chemical compounds for in vitro and in vivo activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. *Crop Protection*, 27(9), 1277–1283. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.04.004>
- de León, L., Siverio, F., López, M., & Rodríguez, A. (2011). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a seedborne tomato pathogen: Healthy seeds are still the goal. *Plant Disease*, 95(11), 1328-1338. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-11-0091>
- Delmont, T. O., & Eren, A. M. (2018). Linking pangenomes and metagenomes: the *Prochlorococcus* metapangenome. *PeerJ*, 6, 1-23. <https://doi.org/10.7717/peerj.4320>
- Divsalar, M. (2014). Study on thermotherapy treatment effects on seed germination and vigor of tomato cultivars. *International Journal of Plant & Soil Science*, 3(6), 799–809. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2014/8466>

- Draper, O., César, C. E., Machón, C., de la Cruz, F., & Llosa, M. (2005). Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(45), 16385–16390. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506081102>
- Dreier, J., Meletus, D., & Eichenlaub, R. (1997). Characterization of the Plasmid Encoded Virulence Region *pat* -1 of Phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(2), 195–206. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.2.195>
- Echandi, E., & Sun, M. (1973). Isolation and characterization of a bacteriophage for the identification of *Corynebacterium michiganense*. *Phytopathology*, 63, 1398–1401. <https://doi.org/10.1094/Phyto-63-1398>.
- Echeverría-Molina, A. (2017). Efecto de factores abióticos y bióticos sobre la estructura de la comunidad microbiana del suelo en un ambiente oligotrófico (tesis de Maestría). Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C, San Luís Potosí, San Luís Potosí.
- Eichenlaub, R., & Gartemann, K.-H. (2011). The *Clavibacter michiganensis* subspecies: Molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 445–464. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095258>
- Eichenlaub, R., Gartemann, K.H., Burger, A. (2007). *Clavibacter michiganensis*, a group of gram-positive phytopathogenic bacteria. In: Gnanamanickam, S.S. (eds) *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_12
- Eren, A. M., Kiefl, E., Shaiber, A., Veseli, I., Miller, S. E., Schechter, M. S., Fink, I., Pan, J. N., Yousef, M., Fogarty, E. C., Trigodet, F., Watson, A. R., Esen, Ö. C., Moore, R. M., Clayssen, Q., Lee, M. D., Kivenson, V., Graham, E. D., Merrill, B. D., Willis, A. D. (2020). Community-led, integrated, reproducible multi-omics with anvio. *Nature Microbiology*, 6(1), 3–6. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00834-3>
- Esquivel-Cervantes, L. F., Tlapal-Bolaños, B., Tovar-Pedraza, J. M., Pérez-Hernández, O., Leyva-Mir, S. G., & Camacho-Tapia, M. (2022). Efficacy of biorational products for managing diseases of tomato in greenhouse production. *Plants*, 11(13), 1638. <https://doi.org/10.3390/plants11131638>
- Fatmi, M., & Schaad, N. W. (2002). Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathology*, 51(2), 149–154. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00675.x>
- Francis, D. M., Kabelka, E., Bell, J., Franchino, B., & St. Clair, D. (2001). Resistance to bacterial canker in tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Disease*, 85(11), 1171–1176. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.11.1171>
- Garay, A. V. A., Rindermann, R. S., & Chávez, B. C. (2014). Vegetables in Mexico: From U.S. competitiveness and opportunities for development. *Journal of Globalization, Competitiveness, and Governability*, 6(3), 70–88. <https://doi.org/10.3232/gcg.2012.v6.n3.04>
- García Romero, I. A. (2019). Genómica de hongos fitopatógenos como herramienta para el desarrollo de estrategias de manejo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(2), 3–5. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n2.84132>

- Gartemann, K.-H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., Gaigalat, L., Goesmann, A., Gräfen, I., Kalinowski, J., Kaup, O., Kirchner, O., Krause, L., Linke, B., McHardy, A., Meyer, F., Pohle, S., Rückert, C., Schneiker, S., 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. <https://doi.org/10.1128/JB.01595-07>
- Gartemann, K.-H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., & Burger, A. (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106(2–3), 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.07.011>
- Geng, R., Cheng, L., Cao, C., Liu, Z., Liu, D., Xiao, Z., Wu, X., Huang, Z., Feng, Q., Luo, C., Chen, Z., Zhang, Z., Jiang, C., Ren, M., & Yang, A. (2022). Comprehensive Analysis Reveals the Genetic and Pathogenic Diversity of *Ralstonia solanacearum* Species Complex and Benefits Its Taxonomic Classification. *Frontiers in Microbiology*, 13(854792), 1-15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.854792>
- Gitaitis, R. D. (1991). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Disease*, 75(8), 834. <https://doi.org/10.1094/PD-75-0834>
- Gleason, M. L. (1991). Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology*, 81(12), 1519. <https://doi.org/10.1094/Phyto-81-1519>
- González, A. J., & Trapiello, E. (2014). *Clavibacter michiganensis* subsp. *phaseoli* subsp. nov., pathogenic in bean. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(5), 1752–1755. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.058099-0>
- González-Gómez, J. P., Soto-Rodriguez, S., López-Cuevas, O., Castro-del Campo, N., Chaidez, C., & Gomez-Gil, B. (2020). Phylogenomic analysis supports two possible origins for latin american strains of *Vibrio parahaemolyticus* associated with Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND). *Current Microbiology*, 77(12), 3851–3860. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02214-w>
- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., & Lopez, R. (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 38, W695–W699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq313>
- Guasch, A., Lucas, M., Moncalián, G., Cabezas, M., Pérez-Luque, R., Gomis-Rüth, F. X., de la Cruz, F., & Coll, M. (2003). Recognition and processing of the origin of transfer DNA by conjugative relaxase TrwC. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(12), 1002–1010. <https://doi.org/10.1038/nsb1017>
- Gudmestad, N. C., Mallik, I., Pasche, J. S., Anderson, N. R., & Kinzer, K. (2009). A Real-Time PCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicu* based on the cellulase A gene sequence. *Plant Disease*, 93(6), 649–659. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-6-0649>
- Hausbeck, M. K., Bell, J., Medina-Mora, C., Podolsky, R., & Fulbright, D. W. (2000). Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp.

- michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology*, 90(1), 38–44. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.1.38>
- Hasegawa M., Kishino H., and Yano T. (1985). Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 22(2), 160–174. <https://doi.org/10.1007/BF02101694>
- Hwang, I. S., Lee, H. M., Oh, E., Lee, S., Heu, S., & Oh, C. (2020). Plasmid composition and the *chpG* gene determine the virulence level of *Clavibacter capsici* natural isolates in pepper. *Molecular Plant Pathology*, 21(6), 808–819. <https://doi.org/10.1111/mpp.12932>
- Jacques, M.-A., Durand, K., Orgeur, G., Balidas, S., Fricot, C., Bonneau, S., Quillévéré, A., Audusseau, C., Olivier, V., Grimault, V., & 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02158-12>
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., & Eichenlaub, R. (2000). The Endo- β -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*, 13(7), 703–714. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.7.703>
- Jukes, T.H. and Cantor, C.R. (1969) Evolution of Protein Molecules. In: Munro, H.N., Ed., *Mammalian Protein Metabolism*, Academic Press, New York, 21–132. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4832-3211-9.50009-7>
- Kaup, O., Gräfen, I., Zellermann, E.-M., Eichenlaub, R., & Gartemann, K.-H. (2005). Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(10), 1090–1098. <https://doi.org/10.1094/MPMI-18-1090>
- Kawaguchi, A., Tanina, K., & Inoue, K. (2010). Molecular typing and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouses in Japan. *Plant Pathology*, 59(1), 76–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02207.x>
- Kleitman, F., Barash, I., Burger, A., Iraki, N., Falah, Y., Sessa, G., Weinthal, D., Chalupowicz, L., Gartemann, K. H., Eichenlaub, R., & Manulis-Sasson, S. (2008). Characterization of a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in Israel. *European Journal of Plant Pathology*, 121(4), 463–475. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9264-z>
- Kolde, R. (2019). Pheatmap: Pretty Heatmaps in R Package. <https://cran.r-project.org/web/packages/pheatmap/index.html>
- Kotan, R., Cakir, A., Ozer, H., Kordali, S., Cakmakci, R., Dadasoglu, F., Dikbas, N., Aydin, T., & Kazaz, C. (2014). Antibacterial effects of *Origanum onites* against phytopathogenic bacteria: Possible use of the extracts from protection of disease caused by some phytopathogenic bacteria. *Scientia Horticulturae*, 172, 210–220. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.03.016>
- Li, X., Tambong, J., Yuan, K. X., Chen, W., Xu, H., André Lévesque, C., & De Boer, S. H. (2018). 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. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002492>

- Li, Y. L., Zhang, W., Zhang, X. Y., & Li, D. Z. (2012). Cross breeding of canker-resistance varieties for tomato and identification by SSR molecular markers. *Hunan Agric Sci*, 13, 13–15.
- Llorens, E., & Agustí-Brisach, C. (2022). Biocontrol of plant diseases by means of antagonist microorganisms, biostimulants and induced resistance as alternatives to chemicals. *Plants* 11(24), 3521. <https://doi.org/10.3390/plants11243521>
- Llosa, M., Gomis-Rüth, F. X., Coll, M., & Cruz, F. de la. (2002). Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiology*, 45(1), 1–8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03014.x>
- Llosa, M., Grandoso, G., & Cruz, F. de la. (1995). Nicking activity of TrwC directed against the origin of transfer of the IncW plasmid R388. *Journal of Molecular Biology*, 246(1), 54–62. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0065>
- Loc-Carrillo, C., & Abedon, S. T. (2011). Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 1(2), 111–114. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590>
- Lowe-Power, T. M., Hendrich, C. G., von Roepenack-Lahaye, E., Li, B., Wu, D., Mitra, R., Dalsing, B. L., Ricca, P., Naidoo, J., Cook, D., Jancewicz, A., Masson, P., Thomma, B., Lahaye, T., Michael, A. J., & Allen, C. (2018). Metabolomics of tomato xylem sap during bacterial wilt reveals *Ralstonia solanacearum* produces abundant putrescine, a metabolite that accelerates wilt disease. *Environmental Microbiology*, 20(4), 1330–1349. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14020>
- Lowry, G. V., Avellan, A., & Gilbertson, L. M. (2019). Opportunities and challenges for nanotechnology in the agri-tech revolution. *Nature Nanotechnology*, 14(6), 517–522. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0461-7>
- Lu, Y., Hatsugai, N., Katagiri, F., Ishimaru, C. A., & Glazebrook, J. (2015). Putative serine protease effectors of *Clavibacter michiganensis* induce a hypersensitive response in the apoplast of *Nicotiana* Species. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(11), 1216–1226. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-15-0036-R>
- Malliarakis, D., Pagoulatou, M. G., Mpalantinaki, E., Trantas, E., Ververidis, F., & Goumas, D. E. (2023). Phylogenetic diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates causing bacterial canker of tomato in Greece. *Journal of Plant Pathology*, 105(4), 1403–1419. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01375-4>
- Medina-Mora, C. M., Hausbeck, M. K., & Fulbright, D. W. (2001). Bird's eye lesions of tomato fruit produced by aerosol and direct application of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Disease*, 85(1), 88–91. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.1.88>
- Méndez, V., Valenzuela, M., Salvà-Serra, F., Jaén-Luchoro, D., Besoain, X., Moore, E. R. B., & Seeger, M. (2020). Comparative genomics of pathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* strains from Chile reveals potential virulence features for tomato plants. *Microorganisms*, 8(11), 1–29. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111679>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0046-x>

- Murray, T., Popham, D. L., & Setlow, P. (1996). Identification and characterization of pbpC, the gene encoding *Bacillus subtilis* penicillin-binding protein 3. *Journal of Bacteriology*, 178(20), 6001–6005. <https://doi.org/10.1128/jb.178.20.6001-6005.1996>
- Nandi, M., Macdonald, J., Liu, P., Weselowski, B., & Yuan, Z. C. (2018). *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management. *Molecular Plant Pathology*, 19(8), 2036–2050. <https://doi.org/10.1111/mpp.12678>
- Nielsen, C. B., Cantor, M., Dubchak, I., Gordon, D., & Wang, T. (2010). Visualizing genomes: techniques and challenges. *Nature Methods*, 7(S3), S5–S15. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1422>
- Oh, E. J., Hwang, I. S., Park, I. W., & Oh, C. S. (2022). Comparative genome analyses of *Clavibacter michiganensis* type strain LMG7333T reveal distinct gene contents in plasmids from other *Clavibacter* species. *Frontiers in Microbiology*, 12(793345), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.793345>
- Oh, E.-J., Bae, C., Lee, H.-B., Hwang, I. S., Lee, H.-I., Yea, M. C., Yim, K.-O., Lee, S., Heu, S., Cha, J.-S., & Oh, C.-S. (2016). *Clavibacter michiganensis* subsp. *capsici* subsp. nov., causing bacterial canker disease in pepper. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(10), 4065–4070. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001311>
- Oliver, R. P. (2024). *Agrios Plant Pathology*. 6. Elsevier. Reino Unido. 858 pp. <https://doi.org/10.1016/C2019-0-04179-9>
- OmniLytics Inc. (2018). AGRIPHAGE-CMM. www.omnilytics.com
- Osdaghi, E., Ansari, M., Taghavi, S. M., Zarei, S., Koebnik, R., & Lamichhane, J. R. (2018). Pathogenicity and phylogenetic analysis of *Clavibacter michiganensis* strains associated with tomato plants in Iran. *Plant Pathology*, 67(4), 957–970. <https://doi.org/10.1111/ppa.12801>
- Osdaghi, E., Robertson, A. E., Jackson-Ziems, T. A., Abachi, H., Li, X., & Harveson, R. M. (2023). *Clavibacter nebraskensis* causing Goss's wilt of maize: Five decades of detaining the enemy in the New World. *Molecular Plant Pathology*, 24(7), 675–692. <https://doi.org/10.1111/mpp.13268>
- Peritore-Galve, F. C., Miller, C., & Smart, C. D. (2020). Characterizing colonization patterns of *Clavibacter michiganensis* during infection of tolerant wild *Solanum* species. *Phytopathology*, 110(3), 574–581. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-19-0329-R>
- Peritore-Galve, F. C., Tancos, M. A., & Smart, C. D. (2021). Bacterial canker of tomato: Revisiting a global and economically damaging seedborne pathogen. *Plant Disease*, 105(6), 1581-1595. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1732-FE>
- Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., & Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes de novo assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1), 1-29. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
- Ramírez, M., & Amador, Z. (2009). Bacteriosis que afectan al cultivo del tacabo. *Revista Avanzada Científica* 12(1). ISSN-e 1029-3450
- Rice, P. A. (2015). Serine Resolvases. *Microbiology Spectrum*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0045-2014>

- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., & Peplies, J. (2016). JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*, 32(6), 929–931. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>
- Ricker, M. D. (1993). Effect of Secondary Spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on yield of northern processing tomatoes. *Plant Disease*, 77(4), 364. <https://doi.org/10.1094/PD-77-0364>
- 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*, 12(10), 852–861. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.10.852>
- Ruiz Alvarado, C. (2018). Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato and chili seeds and farming area of Sinaloa, Mexico. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, 2, 44–54. <https://doi.org/10.29328/journal.jpssp.1001019>
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sandoval, C. (2004). Manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos. Universidad de Talca. Talca, Chile.
- Savidor, A., Chalupowicz, L., Teper, D., Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R., Manulis-Sasson, S., Barash, I., & Sessa, G. (2014). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Vatr1 and Vatr2 transcriptional regulators are required for virulence in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(10), 1035–1047. <https://doi.org/10.1094/MPMI-02-14-0061-R>
- Savidor, A., Teper, D., Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R., Chalupowicz, L., Manulis-Sasson, S., Barash, I., Tews, H., Mayer, K., Giannone, R. J., Hettich, R. L., & 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. <https://doi.org/10.1021/pr200646a>
- Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K. D., Sherry, S. T., Yankie, L., & Karsch-Mizrachi, I. (2023). GenBank 2023 update. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D141–D144. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1012>
- Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics*, 7(11), 1–13. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685>
- Seemann, T., & Grüning, B. (2020, March 27). ABRicate. <https://github.com/tseemann/abricate>
- Sen, Y., Feng, Z., Vandenbroucke, H., van der Wolf, J., Visser, R. G. F., & van Heusden, A. W. (2013). Screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. *Euphytica*, 190(2), 309–317. <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0802-1>
- Sen, Y., Van Der Wolf, J., Visser, R. G. F., & Van Heusden, S. (2015). Bacterial canker of tomato: Current knowledge of detection, Management, Resistance, And interactions. *Plant Disease*, 99(1), 4–13. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-14-0499-FE>
- Sharabani, G., Borenstein, M., Shulhani, R., Lofthouse, M., Chalupowicz, L., Shtienberg, D., &

- Manulis-Sasson, S. (2013). The significance of guttation in the secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato greenhouses. *Plant Pathology*, 62(3), 578–586. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02673.x>
- Sharabani, G., Shtienberg, D., Borenstein, M., Shulhani, R., Lofthouse, M., Sofer, M., Chalupowicz, L., Barel, V., & Manulis-Sasson, S. (2013). Effects of plant age on disease development and virulence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato. *Plant Pathology*, 62(5), 1114–1122. <https://doi.org/10.1111/ppa.12013>
- Servicio de Informacion Agroalimentaria y Pesquera. (2023). Panorama Agroalimentario 2023.
- Singh, A. (2019). CONCAT. Multifasta to concatenated sequence. <https://github.com/abhijeetsingh1704/CONCAT/tree/master?tab=readme-ov-file>
- Sivashankari, S., & Shanmughavel, P. (2007). Views & Challenges Comparative genomics-A perspective. www.bioinformation.net
- Sour, F. M., Khezri, M., & Ghasemi, A. (2023). Resistance response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in different available tomato cultivars in Iran. *Journal of Crop Protection* 12(2), 163-171. <https://20.1001.1.22519041.2023.12.2.4.4>
- Svircev, A., Roach, D., & Castle, A. (2018). Framing the future with bacteriophages in agriculture. *Viruses*, 10(5), 218. <https://doi.org/10.3390/v10050218>
- Tancos, M. A., Chalupowicz, L., Barash, I., Manulis-Sasson, S., & Smart, C. D. (2013). Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(22), 6948–6957. <https://doi.org/10.1128/AEM.02495-13>
- Tancos, M. A., Lange, H. W., & Smart, C. D. (2015). Characterizing the genetic diversity of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* population in New York. *Phytopathology*, 105(2), 169–179. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-14-0178-R>
- Koichiro Tamura, Glen Stecher, Sudhir Kumar. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Aenetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Thapa, S. P., O’Leary, M., Jacques, M. A., Gilbertson, R. L., & Coaker, G. (2020). Comparative genomics to develop a specific multiplex PCR assay for detection of *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, 110(3), 556–566. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-19-0405-R>
- Thapa, S. P., Pattathil, S., Hahn, M. G., Jacques, M. A., Gilbertson, R. L., & 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*, 30(10), 786–802. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0146-R>
- Tian, Q., Chuan, J., Sun, X., Zhou, A., Wang, L., Zou, J., Zhao, W., & Li, X. (2021). Description of *Clavibacter zhangzhii* sp. nov., a phytopathogenic actinobacterium isolated from barley seeds, causing leaf brown spot and decline. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(5). <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004786>
- Uniprot Consortium. (2023). Regulatory protein repA. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P20356/entry>

- Utkhede, R., & Koch, C. (2004). Biological treatments to control bacterial canker of greenhouse tomatoes. *BioControl*, 49(3), 305–313. <https://doi.org/10.1023/B:BICO.0000025373.69584.08>
- Valenzuela, M., Besoain, X., Durand, K., Cesbron, S., Fuentes, S., Claverías, F., Jacques, M. A., & 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. <https://doi.org/10.1111/ppa.12911>
- Valenzuela, M., González, M., Velásquez, A., Dorta, F., Montenegro, I., Besoain, X., Salvà-Serra, F., Jaén-Luchoro, D., Moore, E. R. B., & Seeger, M. (2021). Analyses of virulence genes of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains reveal heterogeneity and deletions that correlate with pathogenicity. *Microorganisms*, 9(7), 1530. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071530>
- Valenzuela, M., Méndez, V., Montenegro, I., Besoain, X., & Seeger, M. (2018). Streptomycin resistance in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from Chile is related to an rpsL gene mutation. *Plant Pathology*, 68(3), 426–433. <https://doi.org/10.1111/ppa.12971>
- van de Vooren, J., Welles, G. W. H., & Hayman, G. (1986). Glasshouse crop production. The Tomato Crop 581–623. Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-009-3137-4_15
- Vega, D., & Romero, A. M. (2016). Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato debris under greenhouse conditions. *Plant Pathology*, 65(4), 545–550. <https://doi.org/10.1111/ppa.12444>
- Villalpando-Aguilar, J. L., Matos-Pech, G., López-Rosas, I., Castelán-Sánchez, H. G., & Alatorre-Cobos, F. (2023). Phage therapy for crops: Concepts, experimental and bioinformatics approaches to direct its application. *International Journal of Molecular Sciences* 24(1), 1-28. <https://doi.org/10.3390/ijms24010325>
- Wang, Y., Deng, S., Li, Z., & Yang, W. (2022). Advances in the characterization of the mechanism underlying bacterial canker development and tomato plant resistance. *Horticulturae* 8(3), 1-17. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8030209>
- Wang, Y., Zhang, Y., Gao, Z., & Yang, W. (2018). Breeding for resistance to tomato bacterial diseases in China: Challenges and prospects. *Horticultural Plant Journal*, 4(5), 193–207. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2018.08.004>
- Wassermann, E., Montecchia, M. S., Correa, O. S., Damián, V., & Romero, A. M. (2017). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains virulence and genetic diversity. a first study in Argentina. *European Journal of Plant Pathology*, 149(1), 35–42. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1159-z>
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Computational Biology*, 13(6), 1-22. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
- Wilson, K. (2001). Preparation of Genomic DNA from Bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology*, 56(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56>
- Wittmann, J., Brancato, C., Berendzen, K. W., & Dreiseikermann, B. (2016). Development of a

tomato plant resistant to *Clavibacter michiganensis* using the endolysin gene of bacteriophage CMP1 as a transgene. *Plant Pathology*, 65(3), 496–502. <https://doi.org/10.1111/ppa.12417>

- Wittmann, J., Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R., & Dreiseikelmann, B. (2011). Genomic and molecular analysis of phage CMP1 from *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis*. *Bacteriophage*, 1(1), 6–14. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.13873>
- Xu, X., Miller, S. A., Baysal-Gurel, F., Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R., & Rajashekara, G. (2010). Bioluminescence imaging of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 3978–3988. <https://doi.org/10.1128/AEM.00493-10>
- Xu, X., Rajashekara, G., Paul, P. A., & Miller, S. A. (2012). Colonization of tomato seedlings by bioluminescent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* under different humidity regimes. *Phytopathology*, 102(2), 177–184. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-11-0090>
- Yang, W.C.; Francis, D.M. (2007) Genetics and breeding for resistance to bacterial diseases in tomato: Prospects for marker assisted selection. *Genetic Improvement of Solanaceous Crops*, 1, 379–419.
- Yañez, A., & Barona, F. (2019). Filogenómica como un enfoque para comprender el carácter anfibionte de *Clavibacter michiganensis* (tesis de maestría). Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, CDMX.
- Yañez-Olvera, A. G., Gómez-Díaz, Á. G., Selem-Mojica, N., Pablo Lara-Ávila, J., Varni, V., Alcoba, F., Croce, V., Inés Siri, M., Rodríguez, L., & Barona, F. (2023). A host shift as the origin of tomato bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis*. 1-36 <https://doi.org/10.1101/2023.07.24.550321>
- Yasuhara-Bell, J., & Alvarez, A. M. (2015). Seed-associated subspecies of the genus *Clavibacter* are clearly distinguishable from *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(3), 811–826. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.000022>
- 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(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-392>