

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Evaluación y caracterización de bacterias presuntivamente *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aisladas de semillas y planta de tomate (*Solanum lycopersicum*) por medio del análisis de la secuencia del gen 16S ADNr y el ensayo de patogenicidad en pilones de tomate.

Trabajo de graduación presentado por Henry Alfredo Canastuj Say, para optar al grado académico de Licenciado en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

2011

Evaluación y caracterización de bacterias presuntivamente *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aisladas de semillas y planta de tomate (*Solanum lycopersicum*) por medio del análisis de la secuencia del gen 16S ADNr y el ensayo de patogenicidad en pilones de tomate.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

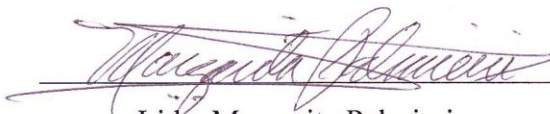
Evaluación y caracterización de bacterias presuntivamente *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aisladas de semillas y planta de tomate (*Solanum lycopersicum*) por medio del análisis de la secuencia del gen 16S ADNr y el ensayo de patogenicidad en pilones de tomate.

Trabajo de graduación presentado por: Henry Alfredo Canastuj Say, para optar al grado académico de Licenciatura en Bioquímica y Microbiología

Guatemala

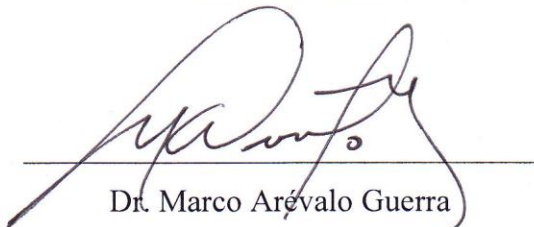
2011

Vo.Bo.:



Lida. Margarita Palmieri

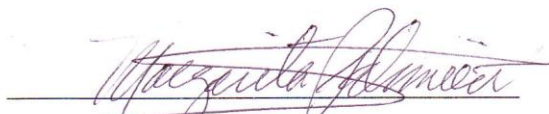
Asesora de Tesis



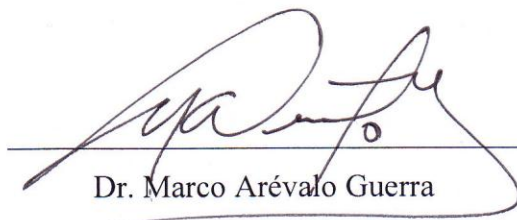
Dr. Marco Arévalo Guerra

Asesor de Tesis

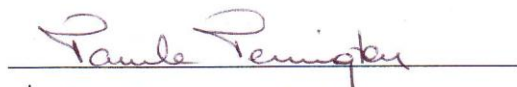
Tribunal Examinador:



Lida. Margarita Palmieri



Dr. Marco Arévalo Guerra



Dra. Pamela Marie Pennington

Directora del Departamento de Bioquímica y Microbiología

Fecha de aprobación:

Guatemala 28 de noviembre de 2011

PREFACIO

- Este Trabajo de Graduación fue desarrollado en colaboración con el Laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle de Guatemala y el Laboratorio Agroexpertos, quienes tuvieron a bien, patrocinar el proyecto con reactivos, equipo, materiales y sobre todo, con sus conocimientos.
- Agradezco a Dios, ser supremo que me permitió rodearme de gente buena y dispuesta a compartir sus conocimientos con dedicación, paciencia y cariño.
- Quiero agradecer muy especialmente a la Fundación Juan Bautista Gutiérrez, a Isabel Gutiérrez de Bosch por hacer realidad mi sueño de ser un profesional egresado de la Universidad del Valle. Gracias a todo el personal de la Fundación y amigos becados que con su ejemplo de excelencia motivaron en mí a dar lo mejor.
- Al Dr. Marco Arévalo y a todo el equipo de Agroexpertos que con su aporte y sobre todo su valiosa amistad motivaron a la culminación de la tesis.
- A la Licenciada Margarita Palmieri por su asesoría y por permitirme hacer uso de las instalaciones, material y equipo del laboratorio para realizar mi investigación. Hago una mención especial a todo el equipo de Protección Vegetal, por el apoyo, su amistad. A la Licda. Elena Dardón y al Licenciado Andrés Avalos por la asesoría brindada durante la investigación.
- A la Dra. Pamela Pennington, por su valiosa y excelente orientación durante todo el proceso de aprendizaje en la carrera y en la tesis.

- A todo el gremio de catedráticos de la Universidad del Valle, por todo el conocimiento y experiencias compartidas que me realizaron como profesional y persona.
- A mis padres, Gregoria y Alfredo, mis hermanos, Yefrin, Jaqueline y Harvey por todos sus sacrificios, constante apoyo y amor.
- Finalmente agradezco a mis amigos quienes de alguna forma contribuyeron en mi formación como profesional.

CONTENIDO

PREFACIO	vi
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
A. Antecedentes.....	3
1. Identidad	3
2. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> es un patógeno de tomate.....	3
3. Síntomas de la enfermedad	5
4. Hospederos.....	7
5. Exopolisacáridos y enzimas extracelulares.....	8
6. Control de Cmm y métodos de detección	9
7. Detección en plantas sintomáticas	11
8. Prueba de patogenicidad	12
9. Prueba de hipersensibilidad	14
10. Características bioquímicas.....	15
11. Análisis de la secuencia 16S ADNr	15
B. Justificación.....	17
C. Objetivos	18
1. Objetivo general.....	18
2. Objetivos específicos	18
II. MATERIALES Y MÉTODOS	20
A. Métodos	20
1. Extracción de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	20
2. Aislamiento en medio semiselectivo D ₂ ANX.....	21

3. Reacción en cadena de la polimerasa para detección del gen 16S ADNr y los plásmidos pCM1, pCM2	22
4. Prueba inmunostrip dirigido a <i>Cmm</i>	24
5. Cultivo.....	24
6. Prueba de la Respuesta Hipersensible.....	24
7. Ensayo de patogenicidad.....	25
8. Reaislamiento de bacterias.....	26
B. Diseño experimental.....	27
1. Enfoque y diseño de la investigación.....	27
2. Definición de la población	28
3. Tipo y número de muestra	28
4. Sujeto de estudio	28
5. Hipótesis	29
6. Análisis de resultados	29
III. RESULTADOS.....	30
IV. DISCUSIÓN.....	34
A. Extracción de bacteria a partir de semilla y planta de tomate.....	34
B. Caracterización microbiológica y molecular de las bacterias aisladas.....	35
C. Análisis de la secuencia del gen 16S ADNr.....	36
D. Respuesta hipersensible en planta indicadora.....	36
E. Ensayo de patogenicidad en plántulas de tomate.....	37
F. Diagnóstico del cáncer bacteriano del tomate en las plántulas infectados.....	40
V. CONCLUSIONES	42
VI. RECOMENDACIONES	45
VII. LITERATURA CITADA	47
VIII. APÉNDICE.....	53
A. Extracción y aislamiento de <i>Cmm</i>	53
B. Caracterización morfológica de bacterias y colonias.....	54

C. Caracterización molecular de bacterias aisladas.	58
D. Cálculos estadísticos realizados	61
E. Respuesta hipersensible en planta indicadora (<i>Mirabilis jalapa</i>).....	65
F. Ensayo de patogenicidad en plántulas de tomate variedad comercial, susceptible a <i>Cmm</i>	67
G. Diagnóstico por PCR de la enfermedad del cáncer bacteriano del tomate ocasionado por <i>Cmm</i> en plántulas infectados.	71
H. Daño tisular ocasionado por bacterias inoculadas en los plántulas de tomate.....	73
I. Secuencias consenso de la región 16S ADNr.	74

LISTA DE CUADROS

Título	Página
Cuadro 1 Criterios de inclusión y exclusión de las variables de estudio.	28
Cuadro 2 Caracterización microbiológica de bacterias aisladas.	30
Cuadro 3 Caracterización molecular de bacterias aisladas.	30
Cuadro 4 Respuesta hipersensible en <i>Mirabilis jalapa</i> e identificación de bacterias por medio del análisis de la secuencia del gen 16S ADNr.	31
Cuadro 5 Diagnóstico de la enfermedad ocasionada a plantas infectadas.	33
Cuadro 6 Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para los datos de la variable área y tratamientos.	61
Cuadro 7 Prueba de Kruskal Wallis.	62
Cuadro 8. Matriz de diferencias de medias de rango observadas entre tratamientos.	64

LISTA DE FIGURAS

Título	Página
Figura 1 Síntomas del cáncer bacteriano del tomate después de la infección con <i>Cmm</i>	4
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> en planta de tomate.	5
Figura 3. Sintomatología del cáncer bacteriano en un estado temprano de la enfermedad.	6
Figura 4 Detección e identificación de <i>Cmm</i> en semillas de tomate.	11
Figura 5. Morfología de las bacterias de <i>Cmm</i> en medio NBY.	12
Figura 6 Árbol filogenético de algunos miembros de la familia Microbacteriaceae.	16
Figura 7 Esquema ilustrativo de la metodología.	20
Figura 8. Prueba de la respuesta hipersensible en planta indicadora.	25
Figura 9 Aislamiento y cuantificación de bacterias fitopatógenas en tejido vegetal.	26
Figura 10 Determinación de virulencia de bacterias inoculadas en plántulas de tomate a los 20 días después de la inoculación.	31
Figura 11 Porcentaje de plántulas de tomate que manifestaron daño severo “muerte” a los 20 días después de la inoculación con bacterias.	32
Figura 12. Comparación del nivel de severidad (escala de 0 a 5) ocasionada por bacterias inoculadas en plántulas de tomate respecto al tratamiento.	32
Figura 13 Comparación de área de lesión ocasionada por bacterias inoculadas en plántulas de tomate respecto al tiempo.	33
Figura 14. Síntomas característicos de <i>Cmm</i> en planta sintomática.	53
Figura 15. Aislamiento de <i>Cmm</i> en medios de cultivo.	53
Figura 16. Colonias típicas de <i>Cmm</i> en medio semiselectivo.	54
Figura 17. Características microbiológicas y morfológicas evaluadas.	54

Figura 18. Migración de los productos de PCR para caracterización molecular.	58
Figura 19. Migración de los productos de PCR para caracterización molecular.	59
Figura 20. Migración de los productos de PCR para la detección del gen 16S ADNr.	60
Figura 21. Pruebas rápidas inmunostrip dirigidos contra <i>Cmm</i>	60
Figura 22. Diagrama de caja	64
Figura 23. Respuesta hipersensible desarrollada en planta indicadora <i>Mirabilis jalapa</i> al ser inoculada con 9 bacterias distintas.	65
Figura 24. Síntomas desarrollados en las plantas de tomate 6 días después de la inoculación con bacterias aisladas de semillas y planta de tomate.	67
Figura 25. Síntomas desarrollados en las plantas de tomate 11 días después de la inoculación con bacterias aisladas de semillas y planta de tomate.	68
Figura 26. Síntomas desarrollados en las plantas de tomate 20 días después de la inoculación con bacterias aisladas de semillas y planta de tomate	69
Figura 27. Migración de los productos de PCR para la detección de <i>Cmm</i>	71
Figura 28. Migración de los productos de PCR para la detección de <i>Cmm</i>	72
Figura 29. Corte longitudinal del tallo de las plántulas inoculados con bacterias evaluadas, aumento 400X.	73

RESUMEN

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*) es una bacteria fitopatógena que causa la enfermedad del cáncer bacteriano en el tomate, considerada como una de las más importantes que afectan al tomate a nivel mundial. Actualmente en Guatemala se han reportado brotes de esta enfermedad en campo e invernadero, lo que ha causado pérdidas millonarias a los productores de tomate. Razón por la cual es importante su descripción y caracterización, con la finalidad de contar con métodos confiables de diagnóstico y establecer monitoreos para controlar la diseminación del patógeno. El objetivo de este Trabajo de Graduación fue precisamente evaluar y caracterizar bacterias similares a *Cmm* aisladas a partir de semillas y planta sintomática de tomate. Para lo cual fue necesario la aplicación de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de los plásmidos que le confieren virulencia, pCM1 y pCM2, así mismo fue realizado el análisis de la secuencia del gen 16S ADNr con la cual se identificó a las bacterias. También se introdujo la prueba de la respuesta hipersensible en planta indicadora *Mirabilis jalapa*, y el uso de las pruebas rápidas inmunostrip dirigido a *Cmm*, pero quizá el aporte más importante fue la aplicación de los postulados de Koch desarrollado en un bioensayo para demostrar la presencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en Guatemala.

Se encontró que bacterias similares a *Cmm* aisladas a partir de semillas de tomate correspondían a los géneros *Micrococcus* spp y *Curtobacterium* spp, las cuales son bacterias de suelo consideradas como saprófitas o no fitopatógenas. En cuatro aislamientos de bacterias a partir de planta sintomática se identificó al patógeno *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y una quinta bacteria se identificó que pertenecía al género *Microbacterium* spp, también saprofita. Las bacterias de *Cmm* fueron positivas para las pruebas inmunostrip, PCR y respuesta hipersensible, además mostraron ser cepas virulentas y severas en el bioensayo desarrollado en plántulas de

tomate. En tanto, las bacterias *Microbacterium* spp, *Micrococcus* spp y *Curtobacterium* spp, mostraron resultados negativos en las pruebas antes mencionadas, demostrando así la especificidad de las pruebas al discriminar entre miembros de la misma familia y géneros interrelacionados. Con esto se concluye que fue posible el aislamiento y caracterización de *Cmm* a partir de planta de tomate, no obstante en las semillas se recomienda la incrementación del número de muestra o la utilización de otras metodologías de extracción.

La divulgación de los resultados será útil para la ejecución de estudios posteriores que busquen incidencia o cepas distintas de *Cmm* en Guatemala, en las cuales se podrán aplicar cualquiera de las metodologías descritas en esta investigación.

I. INTRODUCCIÓN

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*), es una bacteria cuarentenada causante del cáncer bacteriano del tomate y causa pérdidas serias en cultivos de tomate ya sea en campo abierto o en invernadero. El patógeno está presente en la mayoría de las áreas productoras de tomate, incluyendo la región EPPO (Organización de Protección Vegetal Europea y del Mediterráneo). La ocurrencia de *Cmm* es errática, porque los años de ausencia o incidencia limitada y severidad pueden ser seguidos por una epifitía. El tomate es el hospedero económicamente más significativo, pero las infecciones naturales también se sabe que han ocurrido en chile, berenjena y algunas malezas de la familia Solanaceae (Kokoskova *et al.* 2010).

Para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382, se ha mostrado que los determinantes esenciales de patogenicidad yacen en el plásmido. Uno de estos determinantes es el gen *celA* que codifica una β -1,4-endocelulosa, la cual es llevada por el plásmido pCM1 de 27 kb. El segundo factor de patogenicidad conocido es *pat-1*, éste es una serina proteasa putativa codificada en el plásmido pCM2 de 70 kb. Además, han sido identificados genes homólogos a *pat-1* tanto en el plásmido pCM2 como en el cromosoma. Todos los genes requeridos para la infección, la colonización exitosa y la evasión o supresión de las defensas de la planta son llevados en el cromosoma (Gartermann *et al.* 2008).

Las semillas son la principal ruta de transmisión de estas bacterias. La evaluación de las semillas es una de las medidas recomendadas para prevenir su introducción y diseminación. Consecuentemente, la confiabilidad de la prueba de detección de la semilla es crítica. Dos procedimientos son rutinariamente ejecutados por laboratorios; (i), una prueba basada en la dilución en placa en medio semi-selectivo, (EPPO, 2005; ISHI, 2008) la cual es utilizada en muchos países y (ii), una prueba estándar que se basa en inmunofluorescencia (Olivier *et al.* 2010).

En Guatemala, la Asociación Nacional de Productores de Invernadero (ANAPI) indicó que el cáncer bacteriano se detectó en los invernaderos de tomate, por primera vez a finales de 2009. Reportes de agricultores informan pérdidas económicas de hasta Q 4 millones. Según ANAPI, para la cosecha 2010-2011, las ventas estimadas eran de unos 14 millones de kilos —unas 30.8 millones de libras—”, lo cual es un estimado de US\$15 millones (Q120 millones) en ventas (Prensa Libre 2010). Ante este dilema, aún no se había caracterizado a plenitud la presunta bacteria de *Cmm* para confirmar su presencia en Guatemala. Es por tal razón, que uno de los principales aportes de este Trabajo de Graduación consistió en la caracterización de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aislada a partir plantas sintomáticas de tomate.

Otro aporte generado por esta investigación recae en la utilidad metodológica, por establecer una técnica molecular que permitió evaluar si bacterias aisladas de plantas sintomáticas o semillas de tomate eran *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por medio del análisis de la secuencia del gen 16S ADNr. También se realizó el diagnóstico de la bacteria mediante la técnica molecular de PCR, pruebas rápidas inmunostrip y respuesta hipersensible en planta indicadora. Así mismo se evaluó dos parámetros comparativos como lo son la virulencia de la bacteria y el nivel de severidad de la enfermedad, representado por la puntuación individual de la enfermedad (IDSR), esto fue desarrollado por medio de un bioensayo en plántulas de tomate de 4 semanas de edad de variedad comercial susceptible a *Cmm*, basado en los postulados de Koch.

A. Antecedentes

1. Identidad

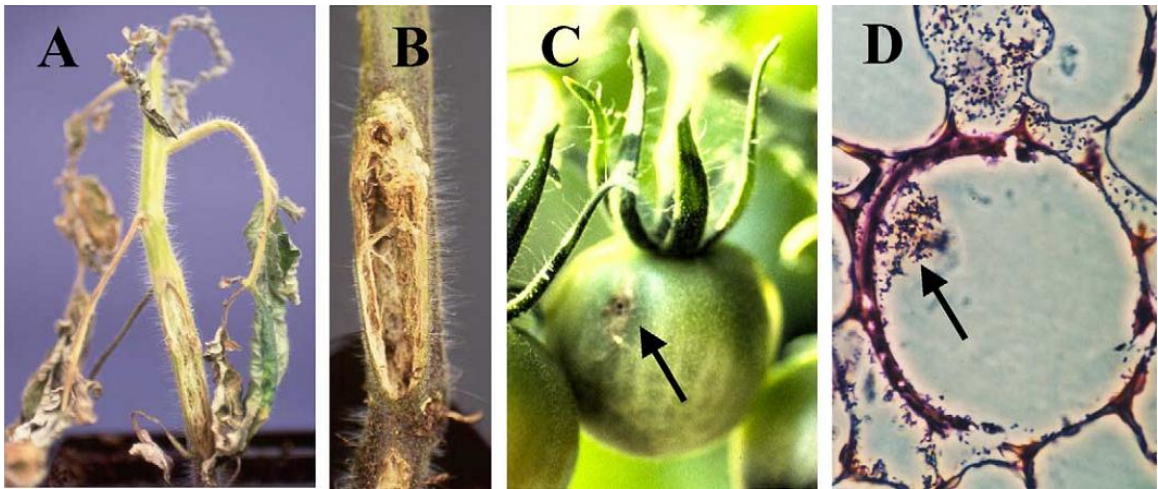
- a. Nombre: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (EPPO 2005).
- b. Sinónimos: *Corynebacterium michiganense* subsp. *michiganense*.
Corynebacterium michiganense pv. *michiganense* (EPPO 2005).

2. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* es un patógeno de tomate. El género bacteriano *Clavibacter* pertenece a las Gram positivas, actinomicetos patogénicos de plantas (familia Microbacteriaceae) y sólo es representada por una única especie, *Clavibacter michiganensis*. Esta especie se subdivide en cinco subespecies de acuerdo a sus diferentes rangos de hospedero. *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* es responsable por las manchas anilladas de la papa, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* causa la marchitez y la plaga del maíz, *C. michiganensis* subsp. *tesselarius* induce la pecas de las hojas y manchas de hojas en el trigo y *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* ocasiona marchitez y enanismo en alfalfa (Jahr *et al.* 1999, Gartemann *et al.* 2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) ocasiona la marchitez y cáncer bacteriano del tomate (*Solanum lycopersicum*) principalmente en regiones húmedas, la cual es considerada como la enfermedad bacteriana más importante de tomate que ocasiona pérdidas económicas sustanciales en el mundo entero (Carlton *et al.* 1998, Gartemann *et al.* 2003).

Cuando el suelo está contaminado con *Cmm*, la bacteria ingresa a la planta por las heridas de la raíz o tallo, luego encuentra la manera de ir hacia el xilema (Figura 1D). El sistema de vasos del xilema que abarca toda la planta le permite una colonización sistémica masiva de la planta con títulos bacterianos superiores a 10⁹ bacterias por gramo de tejido de planta. La marchitez unilateral de las hojas es el primer estadio de la enfermedad. Luego la marchitez se disemina a todas las hojas, las lesiones de cáncer se desarrollan en los tallos y la planta muere (en la Figura 1A se observa la marchitez bacteriana de una planta de tomate en una etapa tardía, y en la Figura 1B se visualiza el síntoma del cáncer en el tallo de la planta). Si la infección ocurre en una etapa tardía de

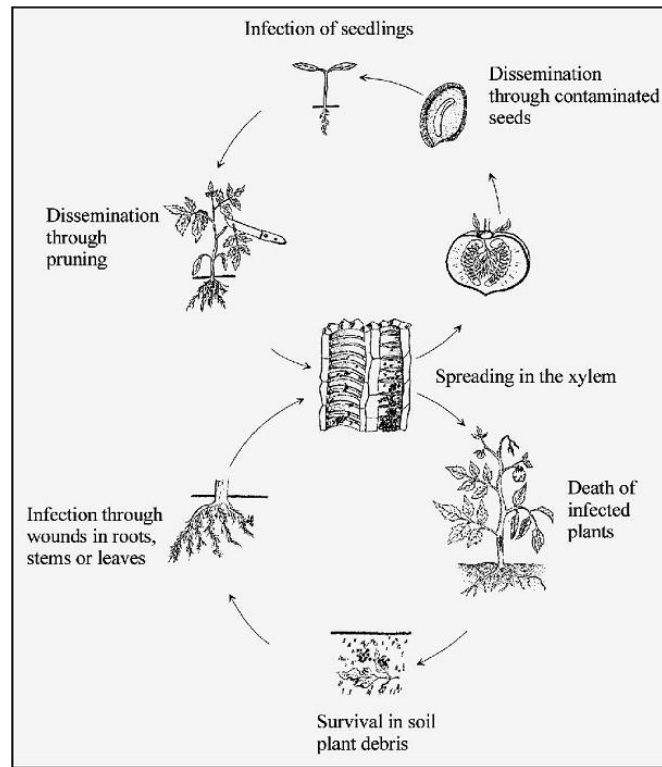
desarrollo de la planta, ésta puede sobrevivir y generar frutos. Los frutos de plantas infectadas pueden tener manchas, a las cuales se les conoce como ojos de pájaro (Figura 1C) y a menudo la semilla será infectada por *Cmm*, de hecho, ésta es la principal fuente de brotes de infecciones de *Cmm* en agricultura (Gartemann *et al.* 2003). En la Figura 1D se muestra una vista microscópica de un corte transversal del xilema de una planta infectada con *Cmm*. La pared de los vasos del xilema ya está parcialmente destruida por las enzimas bacterianas, las cuales permiten la diseminación de la bacteria a los tejidos adyacentes. La flecha indica una agregación de bacterias (Gartemann *et al.* 2003). El ciclo de vida *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, como se muestra en la Figura 2, consiste en la infección de plántulas de tomate que germinan a partir de una semilla contaminada, luego la bacteria puede ser diseminada por medio de la poda o generar más semillas contaminadas en el fruto. La diseminación ocurre en el xilema de donde se propaga hacia las raíces y hojas, ocasionando la muerte de la planta (Eichenlaub *et al.* 2005).

Figura 1 Síntomas del cáncer bacteriano del tomate después de la infección con *Cmm*.



Fuente: Gartemann *et al.* 2003.

Figura 2. Ciclo de vida de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en planta de tomate.



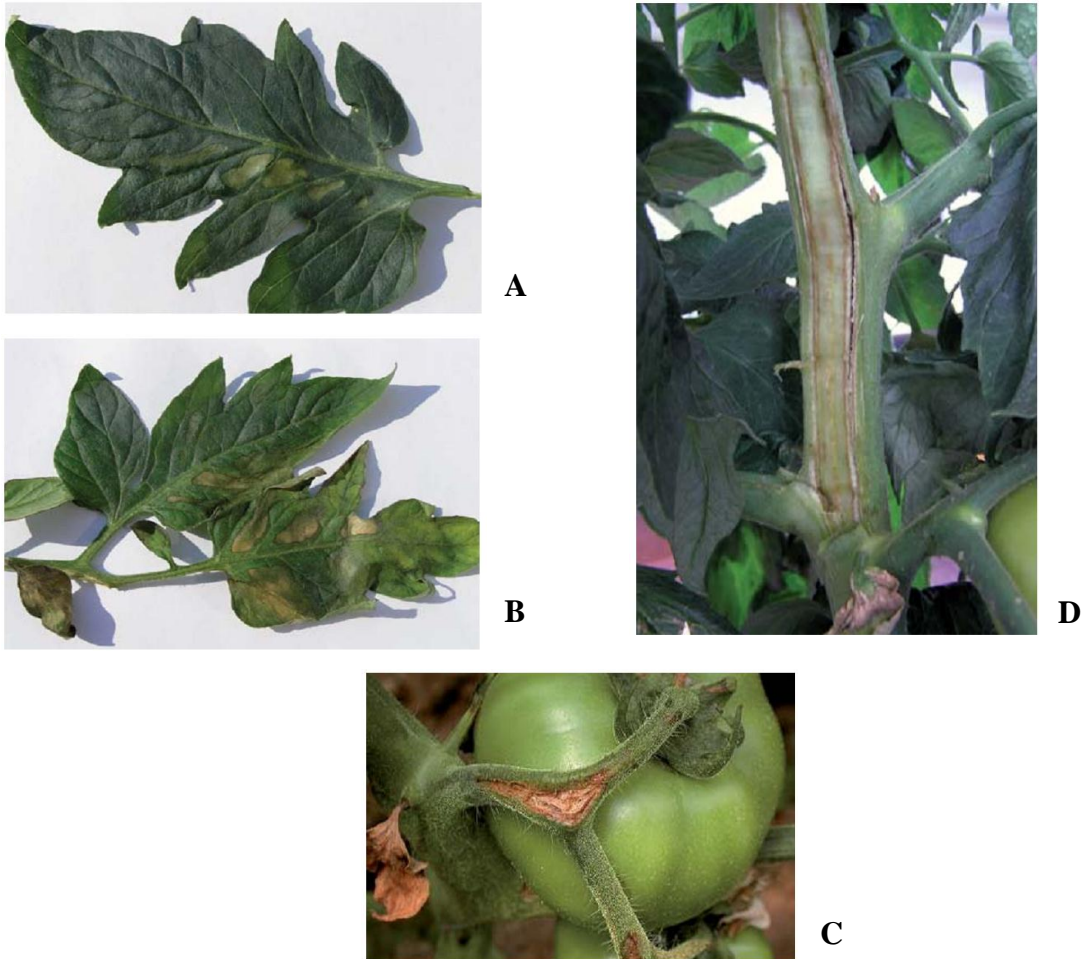
(Fuente: Eichenlaub, Gartemann and Burger 2006).

3. Síntomas de la enfermedad. El cáncer bacteriano es una enfermedad vascular y del parénquima con un amplio rango de síntomas. Los síntomas en la superficie superior de las hojas se presentan como manchas blancas aproximadamente circulares y ligeramente elevadas de alrededor de 1 mm de diámetro. En las primeras etapas del desarrollo de los síntomas, las manchas son difíciles de distinguir. En un cultivo adulto, éstos son normalmente observados en las hojas más maduras que están al menos 1 m sobre la superficie del suelo cuando las plantas tienen entre 1.5 a 2 m de altura. Las manchas pueden expandirse, uniéndose con otras, y pueden llegar a estar rodeadas con tejido necrótico. Las manchas pueden acaecer también en los pecíolos, tallos, pedúnculos y cálices. Las manchas son de 1–3 mm de diámetro, elevadas, cremosas al principio. Estas áreas a menudo viran de color claro a un café oscuro conforme transcurre el tiempo. Los síntomas superficiales pueden ser encontrados en frutos de cualquier etapa, pero son usualmente vistos en los frutos verdes. Las manchas se desarrollan entre 3 y 6 mm de diámetro, tienen centros café oscuro o negros y están rodeadas por un halo blanco, lo cual

se le conoce como ojo de pájaro. Los primeros síntomas de la infección sistémica pueden ser observados como pequeñas áreas de tejido intervenal color verde apagado con apariencia acuosa (Figura 3A y 3B) (Milijasevic *et al.* 2006).

Figura 3. Sintomatología del cáncer bacteriano en un estado temprano de la enfermedad.

(A) Primer síntoma de la infección sistémica, manchas acuosas; (B) Síntomas sistémicos, áreas café necróticas en lámina; (C) División del peciolo; (D) Corte longitudinal del tallo, tejido vascular que varía de color amarillo a café.



(Fuente: Milijasevic *et al.* 2006).

Las lesiones usualmente incrementan en tamaño y son eventualmente acompañadas por una marchitez irreversible, la cual tiene como resultado la muerte de la hoja. Los frutos de las plantas sistemáticamente infectadas pueden detener su desarrollo y caer o tener una maduración desigual. Pueden emerger como jaspeados, con rayas cloróticas

longitudinales y blanqueado interno de los tejidos vasculares. Las plantas con síntomas externos de infecciones sistémicas avanzadas casi siempre muestran uno o más síntomas internos. En los cortes de sección de los tallos, el tejido vascular varía en el color, de amarillo a café (Figura 3D). Ocasionalmente, las cavidades pueden desarrollarse en la médula. También pueden ocurrir rayas y división del tallo y peciolos (Figura 3C) (Milijasevic *et al.* 2006).

Hay un amplio rango de síntomas, los cuales dependen del lugar de producción (invernadero o campo), edad de la planta en el tiempo de la infección, prácticas de cultivo, susceptibilidad de la variedad y la vía de ingreso del patógeno (Carlton *et al.* 1998). Además hay evidencia de algunas cepas que pueden producir síntomas menos severos. En un cultivo de invernadero, la enfermedad puede ser a menudo reconocida en las etapas tempranas por un verde opaco, áreas oleosas entre las venas de las hojas, las cuales se desecan rápidamente a una necrosis blanca y subsecuentemente oscura, dando a la planta una apariencia quemada. Las pequeñas áreas afectadas pueden juntarse y producir una zona necrótica más grande. Bajo condiciones favorables de desarrollo bacteriano (25°-30°C y estrés evapo-transpiración), las hojas enteras se marchitan y encogen dentro de unos pocos días. Finalmente, la planta entera se deseca. Bajo condiciones menos favorables, la marchitez irreversible puede ser retrasada y la planta no muestra ninguna marchitez. Los frutos de plantas sistemáticamente infectadas pueden frenar su desarrollo y caerse o madurar desigualmente (EPPO 2005).

4. Hospederos. El principal hospedero de importancia económica es el tomate, pero el patógeno también ha sido reportado en otros *Lycopersicon* spp y en plantas silvestres de *Solanum douglasii*, *S. nigrum* y *S. triflorum*. Un número de plantas solanáceas son susceptibles a la inoculación artificial. Reportes dudosos de otros hospederos incluyen frijol, arveja y maíz. Se considera que las semillas de las solanáceas son un potencial reservorio del patógeno (EPPO 2005).

5. Exopolisacáridos y enzimas extracelulares. Dado a que la bacteria está localizada principalmente en el xilema de las plantas infectadas, el deterioro físico del transporte de agua ocasiona un estrés severo de agua dando como resultado la marchitez. La producción de exopolisacáridos (EPS) puede ser un factor prominente que contribuya a la adhesión de los vasos del xilema. Como en la mayoría de suelos y plantas que están asociadas a bacterias, *Cmm* produce moléculas de alto peso, ácidos de exopolisacáridos, los cuales tienen múltiples e importantes funciones biológicas. Estos pueden generar una matriz saturada de agua alrededor de la bacteria como una protección contra la deshidratación y ya que éstos están mayoritariamente cargados pueden actuar como un intercambiador iónico, concentrando los minerales y nutrientes alrededor de la bacteria, además de proteger la bacteria atrapando compuestos tóxicos. Particularmente en el contexto de interacción entre bacteria y planta, los EPS pueden prevenir el reconocimiento de la bacteria por parte del sistema de defensa de la planta. También los EPS pueden proteger la bacteria contra componentes del sistema de defensa de la planta bloqueando las aglutininas o lectinas, detoxificación de fitoalexinas o especies reactivas de oxígeno. Por otra parte, los EPS pueden mediar la adhesión de superficies abióticas y biológicas y así promover la infección y colonización de las plantas hospederas, y en este caso representa un prerrequisito esencial para el desarrollo de la enfermedad. La caracterización de los EPS de *Cmm* mostró que éstos parecen ser idénticos a los EPS de *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* teniendo un peso molecular en el rango de 1–10 MDa y consistiendo de fucosa, galactosa y glucosa en una razón de 2:1:1, adornado con acetato y piruvato como grupos laterales (Gartemann *et al.* 2003).

En una bacteria patogénica que causa una enfermedad vascular, los EPS pueden ser un factor significativo por ocasionar el estrés de agua y en efecto es responsable por el desarrollo de síntomas de marchitez en plantas de tomate. Más que eso, los EPS fueron discutidos por representar una fitotoxina. Los EPS purificados de *Cmm* pueden inducir marchitez en cortes de epicotilo de tomate, destruyendo la membrana tilacoidal de cloroplastos aislados e inhibiendo el desarrollo de minicallo de protoplastos de tomate (Gartemann *et al.* 2003).

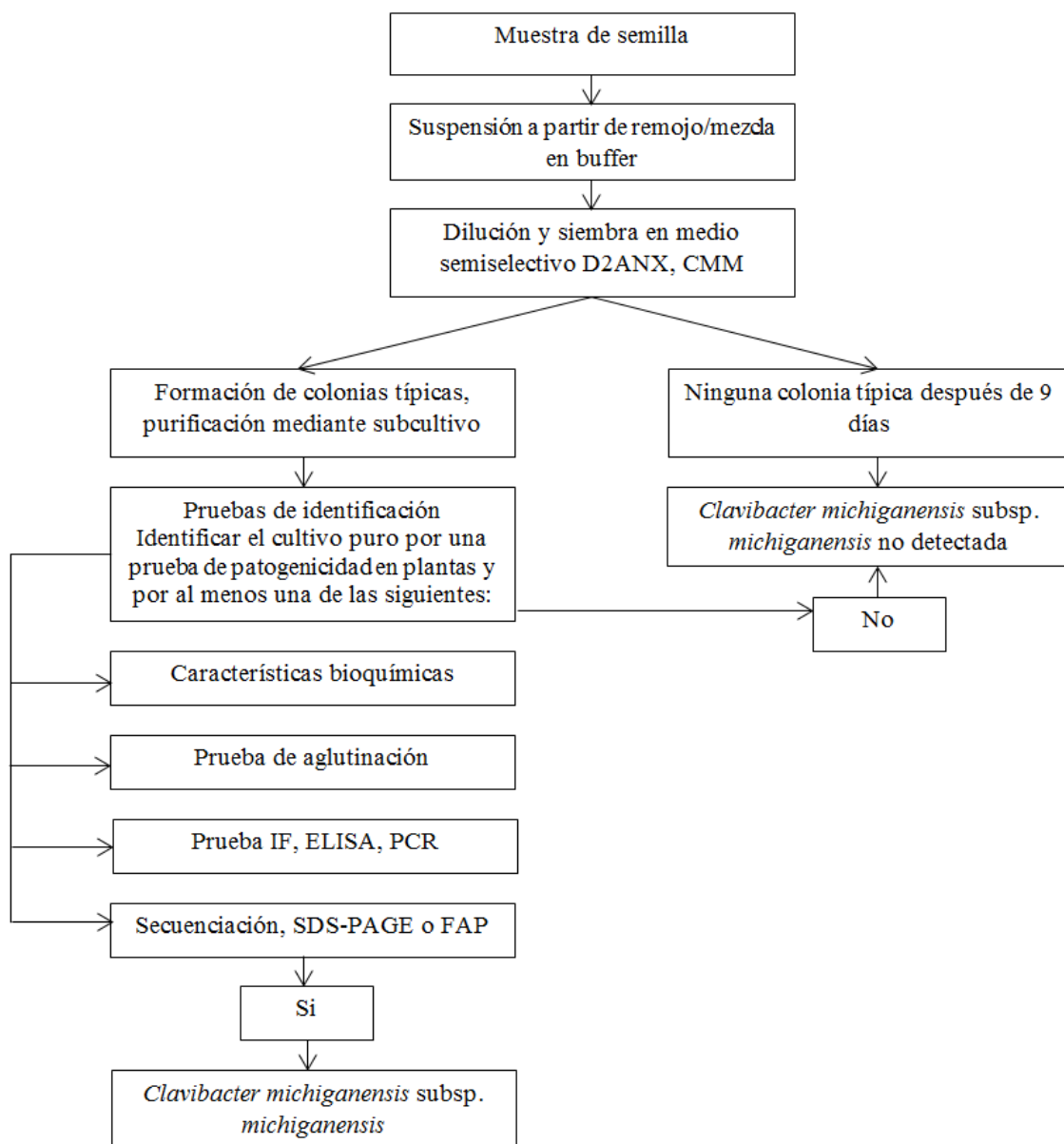
Además de los EPS, *Cmm* puede producir numerosas enzimas extracelulares. En el sobrenadante del cultivo han sido detectadas actividades de poligalacturonasas, endocelulasas, pectinametilsterasas y xilanasas. Los estudios morfológicos de varios laboratorios han sugerido que especialmente estas enzimas extracelulares son capaces de degradar varios componentes de la pared celular de la planta y así pueden atacar enzimáticamente los vasos del xilema y células parenquimáticas adyacentes, jugando un rol importante en el desarrollo de la enfermedad. Está claro que las enzimas extracelulares degradan macromoléculas biológicas que juegan un papel importante en la explotación de todas las posibles fuentes de energía y carbono, sin embargo, el rol crucial de las enzimas extracelulares en la patogenicidad sigue siendo sujeto de estudio (Gartemann *et al.* 2003).

6. Control de *Cmm* y métodos de detección. La diseminación por semilla explica muchos nuevos brotes de cáncer bacteriano y su distribución a nivel mundial. La esporádica y severa naturaleza de esta enfermedad, la capacidad de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* de sobrevivir varios meses en desechos de plantas y semillas bajo condiciones naturales y la ausencia de control efectivo de medidas que afecten los cultivos, la hace una amenaza potencial para todas las áreas productoras de tomate. Es por eso, que la estrategia más importante para controlar el cáncer bacteriano ha sido el uso de semillas libres de patógenos (León *et al.* 2006). La iniciativa internacional de salud de semillas vegetales (ISHI por sus siglas en inglés) y la Organización para la Protección de Plantas Europeas y del Mediterráneo (EPPO) han propuesto la siembra de extractos de semillas sobre medios semiselectivos, seguido por la identificación de colonias sospechosas, como principal procedimiento para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en semillas de tomate. Sin embargo, este lento crecimiento bacteriano puede ser inhibido en el medio de cultivo por otros microorganismos, aún utilizando medio semiselectivo, en el cual las colonias características se desarrollan más lentamente, algunas veces toman más de 10 días (León *et al.* 2006).

Otras técnicas de detección actualmente utilizadas para la detección de *Cmm* son: el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), ensayo de inmunofluorescencia (IFA), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o bioensayos (inoculación de plantas huéspedes con extractos potencialmente contaminados). Cada una de estas técnicas tienen ventajas y desventajas en relación a su carencia de sensibilidad y/o especificidad, costo o tiempo, y requieren cambios bajo condiciones controladas para bioensayos (León *et al.* 2006). En contraste a lo que sucede con las bacterias Gram–negativas que son patogénicas de plantas, aún no ha sido encontrada una variedad de tomate que sea resistente a *Cmm* y todos los esfuerzos por obtener variedades resistentes de tomate para la reproducción no han sido satisfactorios (Gartemann *et al.* 2003).

La única posibilidad de reducir pérdidas en agricultura por la infección de *Cmm* es removiendo y destruyendo las plantas infectadas, ya que sobrevivientes de *Cmm* en el suelo requieren la asociación con material de plantas. También, es necesario certificar la semilla y cortes de tomate como libres de *Cmm*. El método empleado en el biocontrol de patógenos tiene que ser rápido, sensible y específico. En contraste a la detección microbiológica clásica de *Cmm* y por determinación de especies y ensayos de plantas para virulencia, los ensayos inmunológicos que utilizan anticuerpos monoclonales y ELISA son mucho más rápidos. Recientemente se han descrito en la literatura un número de iniciadores específicos de PCR para la detección de *Cmm* (Gartemann *et al.* 2003).

El procedimiento de diagnóstico comprende el aislamiento de *Cmm* a partir de tejido infectado, el diagnóstico presuntivo con una prueba rápida, identificación de los aislamientos presuntivos y determinación de patogenicidad. Una prueba en semillas es específicamente realizado por medio de siembra selectiva, seguido por la identificación de aislados presuntivos y determinación de la patogenicidad (Figura 4). La inmunofluorescencia y el PCR después del enriquecimiento selectivo, combinado con un bioensayo en plántulas de tomate, pueden ser utilizados como una prueba esencial. La detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en plantas jóvenes es errática ya que la localización del patógeno (raíz, tallo u hojas) depende de las condiciones de cultivo de las plántulas (EPPO 2005).

Figura 4 Detección e identificación de *Cmm* en semillas de tomate.

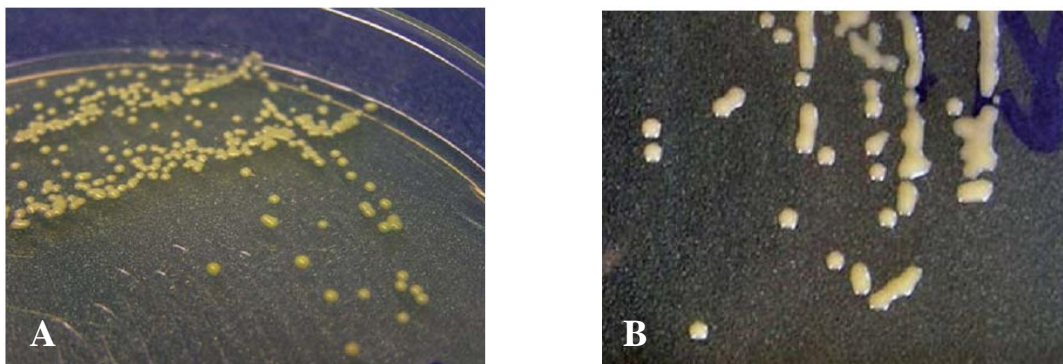
(Fuente: EPPO 2005)

7. Detección en plantas sintomáticas. Las plantas marchitas son cortadas en la base del tallo, en los peciolos quebrados y en las áreas de los tejidos vasculares que presente descoloramiento amarillo oscuro a café. Utilizando un bisturí desinfectado, mojado y flameado en etanol, se cortan pequeños tejidos vasculares e inmediatamente se sumergen en agua estéril y se deja remojar por 10 minutos para la difusión de la bacteria. El exudado bacteriano se siembra sobre agar nutritivo y caldo nutritivo con extracto de

levadura (NBY) y las placas se incuban a 26 °C por 4–7 días. Los aislamientos de las manchas de hojas se realiza utilizando manchas jóvenes con superficies previamente desinfectadas con una toalla de papel humedecida con etanol al 70%. Las manchas se remueven con un bisturí desinfectado, luego es transferido a un pequeño volumen de agua estéril, dentro de una campana de flujo laminar o en presencia del mechero y luego se remoja por 15–20 minutos para la difusión de la bacteria. El tejido de hoja es macerado y la suspensión de la bacteria se siembra en agar nutritivo y medio NBY. Las placas se incuban a 26° C y examinadas cuatro días después. Típicamente se forman colonias de color amarillo claro, redondas, semifluidas de 2–3 mm, las cuales se desarrollan entre 3–4 días después de ser transferidas al medio NBY (Figura 5). Las colonias presuntivas se purifican por subcultivo en medios tales como: agar nutritivo con glucosa (NGA), agar extracto de levadura, dextrosa y carbonato de calcio (YDC) y agar glucosa peptona levadura (YPGA). Las colonias individuales se transfieren a la inclinación del medio basal King (KBM) y son almacenadas a 4° C para estudios posteriores (EPPO 2005, Milijasevic *et al.* 2006).

Figura 5. Morfología de las bacterias de *Cmm* en medio NBY.

A. Colonias bacterianas de *Cmm* sobre agar nutritivo y B. Caldo nutritivo con agar extracto de levadura (NBY) después de 4 días.



(Fuente: Milijasevic *et al.* 2006).

8. Prueba de patogenicidad. Es un experimento final y confirmatorio de que una bacteria aislada a partir de una planta con o sin síntomas realmente es la causante de la enfermedad, ésta puede ser realizada utilizando el huésped del patógeno sospechoso. Esta prueba es especialmente realizada en casos críticos; por ejemplo, cuando un patógeno es

detectado o descrito por primera vez, en disputas legales entre el gobierno y el productor/importador, o entre exportadores y países. Se considera que este ensayo es aún indispensable y obligatorio en muchos esquemas de diagnóstico oficiales (Janse 2005).

En una prueba de patogenicidad siempre deben ser incluidos un control negativo (plantas inoculadas sólo con la solución estéril). Así mismo, cuando sea necesario también se debe incluir un control positivo (utilizando una cepa patogénica conocida del patógeno). Los controles positivos y negativos deben estar siempre separados uno del otro en el invernadero, para evitar cualquier contaminación de los controles y las muestras (Janse 2005).

El ensayo o prueba de patogenicidad debe ser ejecutado como sigue: la suspensión bacteriana es preparada a partir de los aislamientos de las cepas y la cepa de referencia suspendiendo una única colonia en 100 µl de agua destilada estéril. Las plántulas de tomate se cultivan en sustrato de crecimiento estéril a 26° C ($\pm 2^\circ$ C) y una humedad relativa de 70%, estos no deberían ser regados un día antes de la inoculación. Las plántulas se inoculan en el tallo, entre los cotiledones y las hojas verdaderas. Las plantas inyectadas con agua sirven como control negativo. A partir del quinto día se buscan síntomas de marchitez en las plantas. Usualmente la marchitez es evidente dentro de 8 días y las plantas no deberían ser conservadas por más de 20 días. Las bacterias se aíslan a partir de las plantas que muestren marchitez, removiendo una sección del tallo de 1 cm a partir de 2 cm por encima del punto de inoculación. Éstas son suspendidas en amortiguador de fosfato y se diluyen en placa sobre NGA o YPGA. Las colonias sospechosas se cultivan e identifican (EPPO 2005, Milijasevic *et al.* 2006).

Las condiciones ambientales en invernaderos productores de plántulas favorecen la infección bacteriana. Las variaciones de temperaturas entre (15 – 28° C) no tienen efecto sobre el desarrollo del cáncer, pero la alta humedad relativa (87 – 97%) aumenta los síntomas en plántulas de tomate de 2-3 semanas de edad (Xu 2010). La estimación cuantitativa de virulencia se hace posible por medio de la determinación del índice de marchitez, el cual se define como el número de días requeridos hasta que el 50% de las

plantas muestren síntomas de marchitez (Meletzus *et al.* 1993). La expansión de la lesión es medida periódicamente superponiendo las lesiones con una cuadrícula transparente y contando los cuadrados (un cuadro = 6.45 mm²) que cubren la lesión (Francis & Kabelka, 2000).

La incidencia del cáncer bacteriano varía de año en año y entre localización geográfica. La resistencia por parte del hospedero es el principal recurso costo-efectivo para controlar el cáncer bacteriano. Variaciones en el grado de resistencia han sido notadas desde 1937, y un número de variedades de tomate parcialmente resistentes han sido criadas utilizando métodos tradicionales de retrocruzamiento. Sin embargo, no ha habido una variedad comercial aceptable que sea altamente resistente. Esto se debe, en parte, a la herencia poligenética y aditiva de la expresión de genes de resistencia y alelos del cáncer bacteriano (De Vries & Stephens 1997).

9. Prueba de hipersensibilidad. La respuesta hipersensible es una prueba importante y definitiva para separar las bacterias fitopatógenas de las saprófitas. Los actuales protocolos utilizan plantas indicadoras como el tabaco y plantas conocidas como “four o’clock”, cuyo nombre científico es *Mirabilis jalapa* como indicadores de bacterias fitopatógenas Gram negativas y Gram positivas, respectivamente, y la inoculación es lograda por la infiltración de la suspensión de la bacteria en las hojas intactas. (Umesha *et al.* 2008).

Todas las bacterias fitopatógenas producen una reacción hipersensible (HR) en el tejido mesófilo de las hojas. Los saprófitos supuestamente no inducen esta reacción, haciendo de la HR una rápida y útil prueba determinante para diferenciar saprofitos de bacterias patogénicas plantas patógenas. La reacción es inestimable para la caracterización de bacterias fitopatógenas recuperadas a partir de afuera de su huésped o recuperada a partir de huéspedes con infecciones latentes. La mayoría de las bacterias fitopatógenas Gram negativas producen hipersensibilidad en tabaco (*Nicotiana tobaccum* L.) y las bacterias Gram positivas producen hipersensibilidad en las plantas “four o’clock”. A menudo, la inyección de la suspensión de bacterias en las plantas “four

o'clock", no es posible dado a que sus hojas son muy delgadas y delicadas, sin embargo es posible con una muy buena manipulación (Umesha *et al.* 2008).

10. Características bioquímicas. El siguiente conjunto de propiedades fenotípicas están universalmente presentes o ausentes en *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, las cuales deberían ser determinadas: Gram positiva, oxidación metabólica de la glucosa; catalasa positivo, oxidasa negativo, hidrólisis de la esculina positivo; ácido producido aeróbicamente a partir de la manosa y manitol; utilización de acetato de sodio y succinato de sodio como fuente de carbono; crecimiento en presencia de NaCl 6%; hidrólisis del almidón de papa; H₂S a partir de peptona, formación de levano (EPPO 2005).

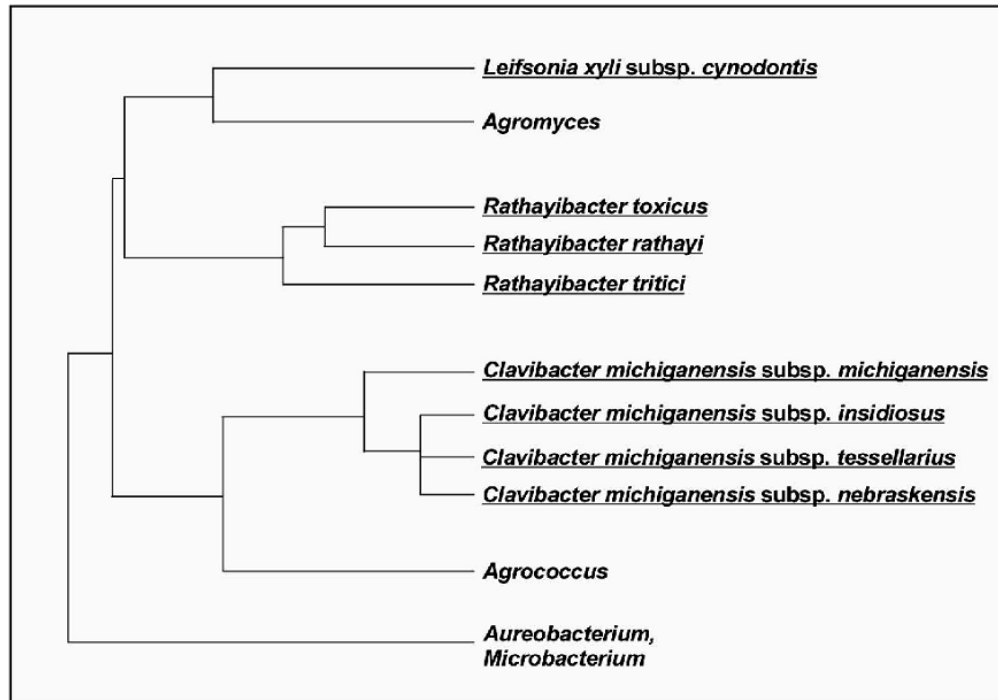
11. Análisis de la secuencia 16S ADNr. La secuencia 16S ADNr tiene regiones hipervariables, donde las secuencias han divergido a través de la evolución. Éstas están a menudo flanqueadas por regiones fuertemente conservadas. Los iniciadores están diseñados para unirse a las regiones conservadas y amplificar las regiones hipervariables. La secuencia de ADN del gen 16S ADNr ha sido determinada para un gran número de especies. De hecho, no hay otro gen que haya sido tan bien caracterizado en muchas especies. Por esta razón, los genes que codifican el ARNr (ADNr) han sido utilizados extensivamente para determinar taxonomía, filogenia y estimar las razones de divergencia entre especies de bacterias (Lee *et al.* 1997).

El análisis de la secuencia de 16S ADNr, ha sido ampliamente utilizado para investigar relaciones filogenéticas entre los microorganismos. La relación filogenética establecida ha formado una base confiable para la clasificación de estos microorganismos. El uso de las secuencias 16S ADNr o ARNr, como herramienta taxonómica es una muy útil y confiable en la clasificación de microorganismos incluyendo aquellos que no pueden ser cultivados (Lee *et al.* 1997).

La actual taxonomía se basa principalmente en la composición de la pared celular y menaquinona, así como en el uso de la información de la secuencia 16S ADNr

(Eichenlaub *et al.* 2006). En la Figura 6, se muestra el árbol filogenético construido a partir del análisis de la secuencia 16S ADNr de algunos miembros de la familia *Microbacteriaceae*.

Figura 6 Árbol filogenético de algunos miembros de la familia Microbacteriaceae. Derivado a partir de la secuencia 16S ADNr, los patógenos de plantas se muestran delineados



(Fuente: Eichenlaub *et al.* 2006).

B. Justificación

El cáncer bacteriano del tomate asociado con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, es una amenaza muy importante para los productores de tomate y chile. Este fitopatógeno causa marchitez y posterior muerte de las plantas infectadas, se le considera como la enfermedad bacteriana más importante del tomate, responsable de reducciones drásticas en el rendimiento y calidad, además de pérdidas económicas sustanciales para la producción de tomate en campo e invernadero (Milijasevic *et al.* 2006).

En Guatemala, la Asociación Nacional de Productores de Invernadero (ANAPI) indicó que el cáncer bacteriano fue detectado por primera vez en invernaderos a finales de 2009. En la cosecha 2009–2010 se dejó de cosechar cuatro millones de kilos de tomate, lo que significó una pérdida de Q20 millones. Reportes de agricultores informan pérdidas económicas de hasta Q 4 millones. Ante este dilema, en Guatemala aún no se ha caracterizado a plenitud la presunta bacteria de *Cmm* para confirmar su presencia. Por tal razón, un aporte importante de esta investigación será la detección y caracterización de *Clavibacter mmichiganensis* subsp. *michiganensis* aislada a partir de semillas o planta sintomática de tomate.

La utilización de métodos moleculares para la caracterización de bacterias, tales como la reacción en cadena de la polimerasa y el análisis de la secuencia del gen 16S ADN_r es muy importante, dado a que poseen la ventaja de tener mayor sensibilidad que otras técnicas como las microbiológicas, se realizan con mayor rapidez para la obtención de resultados y mayor especificidad, con estos es posible determinar la identidad del organismo, su características taxonómicas, etc. Razón por la cual, la relevancia de esta tesis recae en su utilidad metodológica, por establecer técnicas moleculares como el análisis de la secuencia del gen 16S ADN_r, PCRs dirigidos a plásmidos e inmunostrip dirigidos a *Cmm*, que permitirán evaluar si bacterias aisladas de plantas sintomáticas o semillas de tomate contienen la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Otro aporte importante será la introducción de la planta indicadora *Mirabilis jalapa* para

la evaluación de la respuesta hipersensible que ocasiona *Cmm* en esta planta y el establecimiento de un bioensayo desarrollado en plantas de tomate de variedad comercial que permitirá evaluar el desarrollo de síntomas de la enfermedad del cáncer bacteriano, basado en los postulados de Koch.

Las implicaciones prácticas del uso de diferentes técnicas de diagnóstico permitirán también su comparación, y sólo se limitará a la detección y caracterización de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en muestras de semillas de un lote particular y planta de tomate. Sin embargo, en futuras investigaciones que busquen la incidencia de *Cmm* en el país, podrán ser aplicadas cualquiera de las técnicas propuestas, utilizando los mismos análisis y siguiendo la metodología de esta investigación.

C. Objetivos

1. Objetivo general

- Evaluar y caracterizar bacterias similares a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aisladas de semillas y planta de tomate (*Solanum lycopersicum*) por medio del análisis de la secuencia del gen 16S ADNr y la prueba de patogenicidad en plantas de tomate.

2. Objetivos específicos

- Aislar en medio semiselectivo bacterias de semillas y plantas de tomate y seleccionar las similares a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

- Caracterizar las bacterias obtenidas, similares a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por medio del análisis de la secuencia del gen 16S ADNr y PCR dirigidos a los plásmidos pCM1 y pCM2.

- Determinar la respuesta hipersensible de bacterias similares a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por medio de los síntomas desarrollados en la planta indicadora *Mirabilis jalapa*.

- Infectar plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de 4 semanas de edad con las bacterias presuntivas de *Clavibacter michiganensis* subps. *michiganensis*.

- Determinar la virulencia y severidad ocasionada por *Clavibacter michiganensis* subps. *michiganensis* o bacterias inoculadas sobre plántulas de tomate, basado en los síntomas desarrollados 20 días después de la infección y los valores de la puntuación individual de la enfermedad (IDRS) respectivamente.

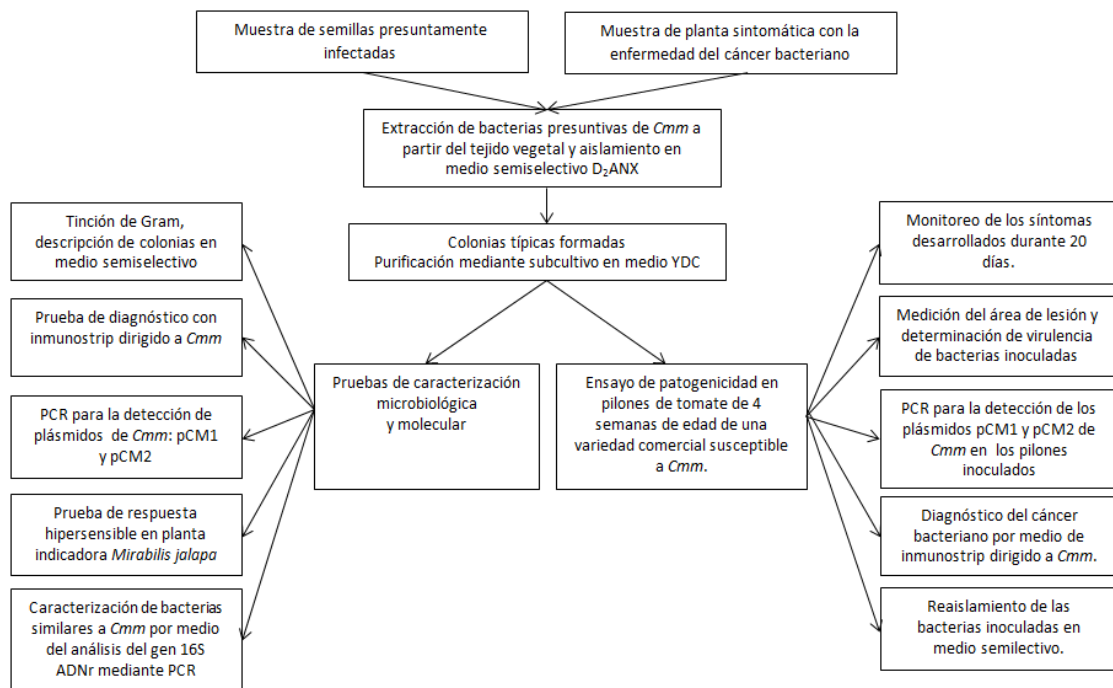
- Secuenciar las amplificaciones del gen 16S ADNr de las bacterias que mostraron patogenicidad en plántulas de tomate que fueron infectadas con *Clavibacter michiganensis* subps. *michiganensis* o bacterias virulentas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Métodos

El procedimiento de evaluación y caracterización de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aislado de semillas y planta de tomate se resumen en el diagrama de flujo de la Figura 7.

Figura 7 Esquema ilustrativo de la metodología.



1. Extracción de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Las muestras de semillas de tomate (100 mg) fueron colocadas dentro de un tubo de reacción estéril de 1.5 ml junto con 900 µl de amortiguador de extracción para semilla (por litro: 7.75 g de Na₂HPO₄, 1.65 g de KH₂PO₄, 0.2 ml de Tween 20, 0.5 g de Na₂S₂O₃, ajustado a pH 7.4). La mezcla fue incubada por una noche (como mínimo 14 horas) a 4 °C, luego fue macerada por al menos 7 min con un pistilo de plástico previamente desinfectado con etanol al 70%, hasta obtener un mezcla de apariencia blanca (International Seed Federation 2008, 2011).

Para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en semillas de tomate, es recomendable utilizar una sub-muestra mínima de al menos 5,000 semillas, tomando en consideración que al menos un 1% de las semillas está infectada (International Seed Federation 2011). No obstante, basado en los análisis realizados por el laboratorio de Protección Vegetal de la Universidad del Valle, durante un brote registrado en 2010, se encontró que el 32% de las muestras de semillas analizadas de un lote en particular fueron positivas para *Cmm* utilizando la técnica de diagnóstico de PCR. Por esta razón, se analizaron submuestras de 100 semillas, esperando que al menos 32% de las semillas fueran positivas. El análisis fue realizado en triplicado para tener mayor representatividad.

El aislamiento de *Cmm* de tejido vegetal fue realizado en una planta de tomate de variedad comercial que presentaba los síntomas característicos de la enfermedad del cáncer bacteriano. El procedimiento de aislamiento fue realizado siguiendo el protocolo recomendado por la EPPO (2005), donde se utilizó parte del tallo y hojas que mostraban lesiones necróticas. El procedimiento posterior de dilución en placa en medio semiselectivo se describe a continuación.

2. Aislamiento en medio semiselectivo D₂ANX. Fueron preparadas diluciones seriadas de diez (hasta 10⁻²) del extracto de semilla o planta con amortiguador estéril de extracción. Luego se cultivó 0.1 ml del extracto concentrado y las respectivas diluciones en cada una de las placas de medio semiselectivo D₂ANX (por litro; 2.0 g de extracto de levadura, 4.0 g de caseína ácida hidrolizada, 10 g de glucosa, 0.3 g de MgSO₄ 7H₂O, 1.0 g de NH₄Cl, 1.2 g de trizma base, 15 g de bacto agar y suplementado con los siguientes antibióticos 28 mg de ácido nalidíxico, 10 mg de sulfato de polimixina y 28 mg de nistatina). Las placas fueron incubadas en oscuridad a 28 °C durante 10 días, durante la incubación fueron examinadas en los días 5, 7 y 10, en búsqueda de presencia de colonias con la morfología típica de *Cmm*. En medio semiselectivo D₂ANX la apariencia de *Cmm* es de color amarilla, elevado y mucoide (De Vries *et al.* 1997). Cuando las colonias cultivadas no están bien separadas, la forma redonda no siempre es visible (International Seed Federation 2008, 2011).

Una vez identificada la presunta bacteria *Cmm* por morfología, se realizó el subcultivo en medio no selectivo YDC (por litro; 10 g de extracto de levadura, 20 g de dextrosa, 20 g de CaCO₃, 15 g de Agar). Las placas fueron incubadas a 26 °C por 3–5 días. Luego fueron examinadas en búsqueda de la presencia de colonias con la morfología típica de *Cmm*. En medio YCD la apariencia de *Cmm* es amarillo, elevado y mucoide (De Vries *et al.* 1997).

3. Reacción en cadena de la polimerasa para detección del gen 16S ADNr y los plásmidos pCM1, pCM2. La extracción de ADN de las bacterias fue realizada por medio de la suspensión de células con una ligera turbidez en 500 µl de agua destilada estéril a partir de las colonias sospechosas en medio YDC. El cultivo no fue mayor a 5 días después de la siembra. La suspensión de bacterias fue calentada por 5 min a 95°C, luego se almacenó a -20°C hasta que fue realizado el análisis por PCR (International Seed Federation 2011).

Los iniciadores utilizados para el análisis del gen 16S ADNr fueron propuestos por Kaneshiro, Mizumoto & Alvarez (2006), estos iniciadores 264F y 1078R han sido ampliamente utilizados para realizar el análisis de secuencia en la región 16S del ADN ribosomal. El iniciador sentido (264F) y antisentido (1078R) comprenden la siguiente secuencia respectivamente; 5′–GAT GAT CAG CCA CAT TGG GAC– 3′ y 5′–CCC AAC ATC TCA CGA CAC GAG– 3′. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue ejecutada utilizando un volumen de reacción de 25 µl, la cual contenía lo siguiente: 5 µl de amortiguador de reacción “5X Green GoTaq[®] Reaction buffer” de la casa comercial Promega (No. Catálogo M7911), 1.2 µl de dNTP mix 10mM, 1 µl de cada iniciador (10 µM cada uno), 1 µl de ADN genómico (≈50 ng) y 0.25 U de GoTaq ADN polimerasa de la casa comercial Promega (No. Catálogo M7122). El siguiente programa fue utilizado en el termociclador Eppendorf Personal: 1 ciclo de 5 min a 94° C; seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 s (desnaturalización del ADN); 58 °C por 30 s (anillamiento de los iniciadores) y terminación con una extensión final a 72 °C por 90 s (Patrik & Rainey 1999, EPPO 2005).

Las amplificaciones por medio de PCR dirigido a los plásmidos pCM1 y pCM2 de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* fueron realizadas con los iniciadores Cm3, Cm4 y CMM5, CMM6 descritos por Santos *et al.* (1997) y Dreier *et al.* (1995) respectivamente. El iniciador sentido (CMM5) y antisentido (CMM-6) contienen la siguiente secuencia respectivamente: 5'-GCG AAT AAG CCC ATA TCA A- 3' y 5'-CGT CAG GAG GTC GCT AAT A- 3'. La mezcla de reacción de 25 μ l, contenía 2.5 μ l de amortiguador de reacción "10X Reaction buffer con MgCl₂" de la casa comercial Novagen, 1 μ l de MgCl₂ 25 mM, 1.5 μ l de dNTP mix 10mM, 0.75 μ l de cada iniciador (10 μ M cada uno), 5 μ l de ADN genómico y 0.25 U de Taq ADN polimerasa de la casa comercial Novagen. En tanto, los iniciadores propuestos por Santos *et al.* (1997), Cm3 (5'-CCT CGT GAG TGC CGG GAA CGT ATC C- 3') y Cm4 (5'-CCA CGG TGG ATG CTC GCG AGA T- 3') contenían en 25 μ l de reacción: 2.5 μ l de amortiguador de reacción "10X Reaction buffer con MgCl₂" de la casa Novagen, 1.25 μ l de dNTP mix 10mM, 0.80 μ l de cada iniciador (10 μ M cada uno), 5 μ l de ADN genómico y 0.25 U de Taq ADN polimerasa de la casa comercial Novagen. El siguiente programa fue utilizado en el termociclador PTC 100 Master Research: 1 ciclo de 2 min a 95° C; seguido de 35 ciclos de 95 °C por 45 s (desnaturalización del ADN); 62 °C por 60s (anillamiento de los iniciadores) y terminación con una extensión final a 72 °C por 60 s.

Los productos de PCR fueron visualizados en electroforesis de gel de agarosa al 1% (p/v) en amortiguador Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X, el cual fue sometido a las siguientes condiciones, 85 voltios por 45 min. Los fragmentos de ADN fueron revelados por medio de la tinción en solución de bromuro de etidio (0.5 μ g ml⁻¹, i.e. 50 μ l de una solución stock de 10 mg ml⁻¹ en 1 litro de TAE) y transiluminación bajo luz UV (Patrik & Rainey 1999, EPPO 2005).

Las amplificaciones de ADN por medio de la PCR dirigido al gen 16S ADNr y a los plásmidos de *Cmm*, utilizaron como control positivo una muestra de ADN genómico extraído de la cepa de referencia A300 de *Cmm*, la cual fue aislada en plantas de tomate infectadas en Ohio y que pertenece al tipo de perfil genético BOX-PCR A. La cepa es del tipo silvestre y virulenta (Xu *et al.* 2010).

4. Prueba inmunostrip dirigido a *Cmm*. Se utilizó la prueba rápida ImmunoStrip® Cmm de la casa comercial Agdia, Inc. Catálogo No. STX 44001 para la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en cultivo puro y planta sintomática. La prueba inmunostrip está específicamente dirigida a los polisacáridos extracelulares (EPS) asociados con *Cmm*. La ejecución de la prueba fue realizada siguiendo las indicaciones del fabricante.

5. Cultivo. El cultivo puro de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* fue promovido mediante la siembra de las bacterias en medio semiselectivo D₂ANX y el medio general YDC. El inóculo para la infección de la planta indicadora *Mirabilis jalapa* fue preparado por medio de la suspensión de bacterias en agua estéril, ésta fue ajustada espectrofotométricamente a 600 nm, obteniéndose un densidad óptica de 0.2 equivalente a 10⁶ UFC/ml respectivamente (De Vries *et al.* 1997).

6. Prueba de la respuesta hipersensible. Las bacterias de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y similares a *Cmm*, extraídas de semillas y planta de tomate fueron evaluadas en una planta indicadora conocida como; “four o’clock” (*Mirabilis jalapa*) para la respuesta de hipersensibilidad (HR). Para esta prueba, las plantas fueron cultivadas en una mezcla de suelo estéril hasta una edad de 6 semanas. La suspensión de bacterias (10⁶ UFC/ml) fue inyectadas en hojas completamente expandidas de la planta, para esto se utilizó jeringas sin agujas, asegurándose que la bacteria infiltrara en los espacios intercelulares, tal como se muestra en la Figura 8. Las plantas inoculadas fueron colocadas por más de 48 h en un sistema aislado a una temperatura controlada de 26° C y humedad relativa superior a 90%, ver Figura 8B. El control negativo fue realizado con agua estéril. Típicamente, la cepa virulenta de *Cmm* induce una respuesta hipersensible con características necróticas en las áreas infiltradas en aproximadamente 36 a 48 horas. (Xu *et al.* 2010).

Figura 8. Prueba de la respuesta hipersensible en planta indicadora.

A. Inoculación de bacterias por infiltración en los espacios intervenales de la hoja *Mirabilis jalapa*, B. Condiciones de incubación de las plantas indicadoras, humedad relativa >90% y temperatura cercana a 26°C, con luz.



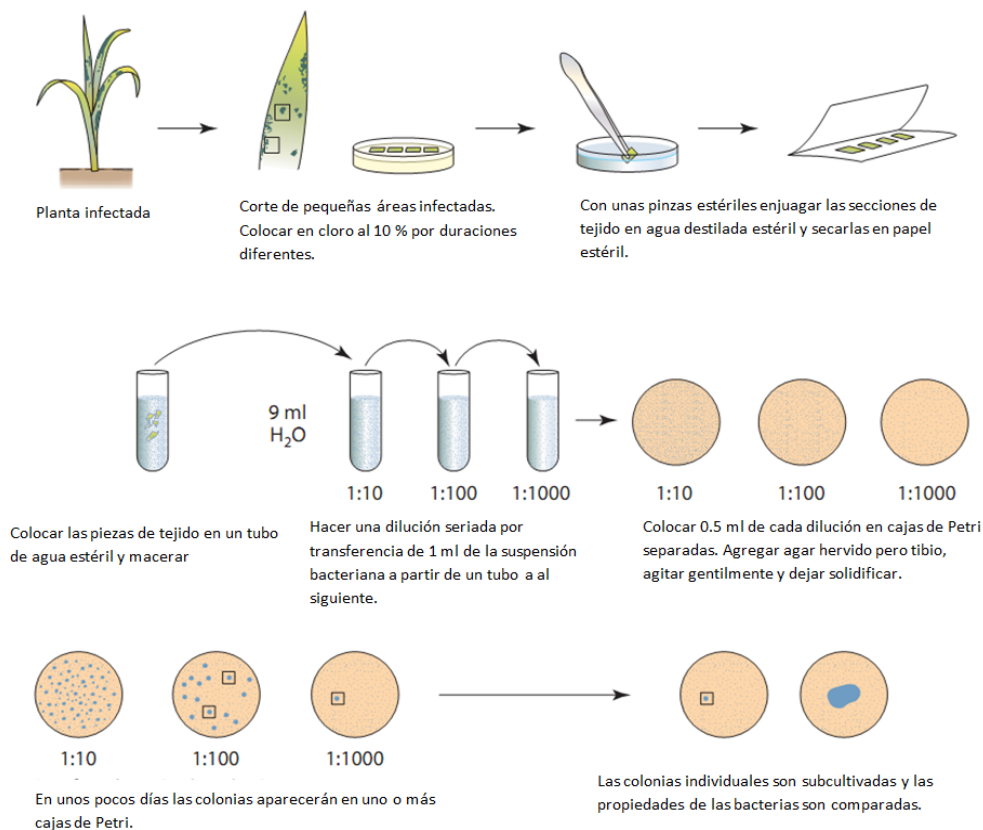
7. Ensayo de patogenicidad. Esta prueba fue realizada inoculando bacterias de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* o similares a *Cmm* en plántulas de tomate de una variedad comercial susceptible (4 semanas de edad). La inoculación fue realizada con palillos de dientes estériles, los cuales fueron sumergidos sobre la colonia de interés cultivada en medio YDC, posteriormente el palillo fue insertado en la región del tallo entre los cotiledones y la primera hoja verdadera. El mismo procedimiento fue simulado para el control negativo, pero con agua estéril (International Seed Federation 2011). Las plantas inoculadas fueron incubadas a 25 °C con una humedad relativa mayor a 80% (Meletzus *et al.* 1993). El monitoreo de los síntomas desarrollados fue realizado durante un periodo de 20 días. Como referencia, se sabe que una cepa virulenta de *Cmm* causa marchitez de las hojas entre los 6–20 días después de la infección (Dreier *et al.* 1995). Los síntomas típicos causados por *Cmm* son formación de clorosis en el sitio de inoculación, seguido por cáncer en tallo y marchitez en las hojas verdaderas (International Seed Federation 2011).

La severidad de la enfermedad es la proporción de área o cantidad de tejido de planta que está enfermo (Agrios 2005) y fue calculada como la expansión de las lesiones de marchitez mostradas en el área de inoculación, ésta fue medida cada 2 días después de manifestarse los primeros síntomas, hasta alcanzar el período de observación de 20 días.

Esta medición se realizó cubriendo la lesión con una cuadrícula transparente, en la cual se cuantificó el área de la lesión en (mm^2).

8. Reaislamiento de bacterias. Después del período de observación de 20 días, fue realizado el reaislamiento de las bacterias a partir del tejido vegetal infectado, éste fue hecho como se ilustra en la Figura 9. Las muestras de tejido vegetal (0.5 g) fueron suspendidas en 5 ml de solución estéril de amortiguador fosfato (pH 7.4; 10 mM) y se dejó difundir por aproximadamente 20 minutos. Luego fue realizado el método de dilución en placa hasta 10^{-2} , para luego cultivarse 0.1 ml de la dilución sobre medio semiselectivo D₂ANX. La incubación fue realizada entre 26–28 °C y la observación de las colonias se hizo 5 y 7 días después (Meletzus *et al.* 1993).

Figura 9 Aislamiento y cuantificación de bacterias fitopatógenas en tejido vegetal.



(Fuente: modificado de Agrios 2005).

En este estudio, las bacterias fueron consideradas como virulentas si las plantas inoculadas exhibieron cáncer en el sitio de inoculación y algún grado de marchitez en las hojas. Las bacterias consideradas como hipovirulentas son aquellas que ocasionaron únicamente cáncer en el tallo. Y las bacterias no virulentas son aquellas que no manifestaron ningún síntoma de la enfermedad en las plantas inoculadas (Kaneshiro *et al.* 2006).

La severidad también fue evaluada por medio de la puntuación individual de la enfermedad (IDRS, por sus siglas en inglés), esto se basó en la evaluación visual de la severidad de los síntomas utilizando una escala de puntuación de la enfermedad de 0 a 5. Un puntaje de 0 no representa ningún síntoma, y un punto se asignó a cada uno de los siguientes síntomas: necrosis (1), cáncer (2), marchitez de la primera hoja (3), marchitez de la segunda hoja (4) y finalmente marchitez de la tercera hoja (5). Así mismo, un medio punto se deduce si los síntomas son severos. Utilizando este sistema, una planta con necrosis severa, marchitez en las dos hojas y cáncer recibe un IDRS de 4.5 y una planta con necrosis leve, recibe un IDRS de 1.5. La muerte de la planta fue puntuada como 5, las Figuras 25, 25 y 26 del Apéndice F, muestran ejemplos de cómo se ponderó la enfermedad del cáncer bacteriano utilizando la escala IDRS de 0 a 5 (Francis & Kabelka 2001).

B. Diseño experimental

1. Enfoque y diseño de la investigación. Este Trabajo de Graduación abordó un enfoque mixto, de alcance descriptivo y diseño de experimento puro.

El diseño experimental fue completamente al azar, donde la unidad experimental fue representada por cinco plantas de tomate. El experimento se realizó a nivel de invernadero complementado con trabajos en laboratorio. El tratamiento consistió en plantas sanas de tomate de cuatro semanas de edad que fueron inoculadas con bacterias de *Cmm* aislada de planta de tomate y bacterias similares a *Cmm* en morfología de colonia y tinción de Gram aisladas de semillas de tomate.

2. **Definición de la población.** Todas las plántulas de tomate manzano infectados y no infectados con *Clavibacter michiganensis* subps. *michiganensis* o con bacterias similares a ésta.

3. **Tipo y número de muestra.** En este experimento se evaluaron 10 tratamientos, cada uno conformado por un total de 15 plántulas de tomate. Sin embargo, cada grupo fue dividido en 3 réplicas. Así mismo se contó con un control negativo, constituido por 15 plántulas de tomate. El control negativo fue inoculado con agua estéril bajo las mismas condiciones que las experimentales.

4. **Sujeto de estudio.** Se utilizaron plántulas de tomate manzano susceptible a *Cmm* de 4 semanas de edad después de la germinación, estos fueron tomados en cuenta si contaban con los criterios enlistados en el Cuadro 1.

Cuadro 1 Criterios de inclusión y exclusión de las variables de estudio.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Plántulas de tomate que dieron negativo a la prueba rápida inmunostrip dirigido contra <i>Clavibacter michiganensis</i> subps. <i>michiganensis</i> .	Plántulas que estén infectados por <i>Clavibacter michiganensis</i> subps. <i>michiganensis</i> .
Plántulas no infectadas por algún otro patógeno. Para esto se realizaron pruebas contra <i>Ralstonia solanacearum</i> y los virus TMV y TSWV.	Plántulas que muestren síntomas de infección por virus, bacterias u hongos.
Plántulas que provengan de semillas certificada como libres de patógenos.	Plántulas cuya semilla sea desconocida o la procedencia sea desconocida.
Plántulas que se encuentren en la edad y condiciones adecuadas para ser inoculados, es decir 4 semanas.	Plántulas de diferentes edades; menores de 3 semanas y mayores de 5 semanas

5. Hipótesis

- a. Hipótesis nula. Las bacterias extraídas a partir de semillas de tomate de una variedad comercial no muestran síntomas de patogenicidad en el bioensayo desarrollado en tomate.
- b. Hipótesis alternativa. Las bacterias extraídas a partir de semillas de tomate de una variedad comercial muestran síntomas de patogenicidad en el bioensayo desarrollado en tomate.

6. Análisis de resultados

- a. Análisis estadístico. Se utilizó el programa estadístico SPSS® versión 12 y la hoja de cálculo Microsoft Excel, para aplicar la prueba de normalidad de los datos y en base a esto utilizar pruebas paramétricas o no paramétricas. La inferencia estadística y los cálculos realizados se muestran en el Apéndice D.
- b. Análisis de la secuencia del gen 16S ADNr. Se utilizó el programa Sequencher 4.10.1, para visualizar el archivo ABI, en este se realizó una contigüidad de las secuencias y se buscó una secuencia consenso, la cual se utilizó para buscar coincidencias en el programa del NCBI, BLASTn. Se tomaron como resultados aquellas búsquedas que mostraron un porcentaje de similitud arriba del 99%, respecto a la secuencia encontrada en la base de datos. La secuencia consenso y la búsqueda de coincidencia mediante la alineación con la base de datos del NCBI se muestran en el Apéndice I.

III. RESULTADOS

Cuadro 2 Caracterización microbiológica de bacterias aisladas.

ID	Procedencia	Tinción de Gram	Morfología de colonias en medio de cultivo semiselectivo D ₂ ANX ¹				
			Color amarilla	Elevada	Irregular	redonda	Mucoide
Muestra 1	Semilla	Coco Gram positivo	+	-	-	+	+
Muestra 2	Semilla	Bacilo Gram positivo	+	+	+	-	+
Muestra 4	Semilla	Bacilo Gram positivo	+	+	+	-	+
Muestra 5	Semilla	Coco-bacilo Gram positivo	+	+	+	-	+
Muestra A	Planta	Bacilo Gram positivo	+	+	-	+	+
Muestra B	Planta	Bacilo Gram positivo	+	+	-	+	+
Muestra C	Planta	Bacilo Gram positivo	+	+	-	+	+
Muestra D	Planta	Bacilo Gram positivo	+	+	-	+	+
Muestra E	Planta	Bacilo Gram positivo	+	+	-	+	+

¹Ver Figura 17 en Apéndice B.

Cuadro 3 Caracterización molecular de bacterias aisladas.

ID	Prueba Inmunostrip ¹ dirigido a <i>Cmm</i>	PCR ² dirigido a plásmido pCM1 con iniciadores Cm3-Cm4	PCR dirigido a plásmido pCM2 con iniciadores CMM5-CMM6	Análisis secuencia gen 16S ADNr
Muestra 1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Muestra 2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Muestra 4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Muestra 5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Muestra A	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Muestra B	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
Muestra C	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Muestra D	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
Muestra E	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

¹Ver Figura 21 del Apéndice B

²Ver Figura 18 y Figura 19 del Apéndice B

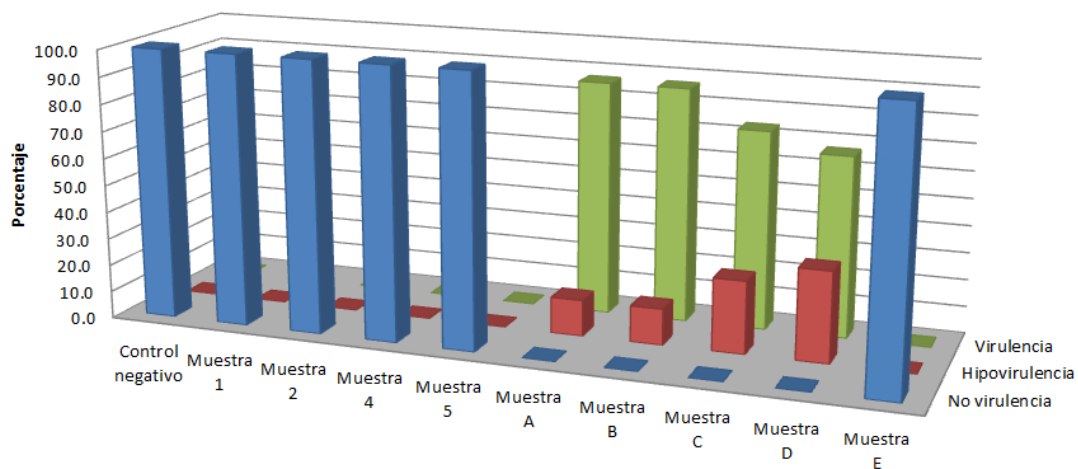
Cuadro 4 Respuesta hipersensible en *Mirabilis jalapa* e identificación de bacterias por medio del análisis de la secuencia del gen 16S ADNr.

ID	RH en <i>Mirabilis jalapa</i>	² Secuenciación gen 16S ADNr
Muestra 1	Negativo	<i>Micrococcus</i> spp
Muestra 2	Negativo	<i>Curtobacterium</i> spp
Muestra 4	Negativo	<i>Curtobacterium</i> spp
Muestra 5	Negativo	<i>Curtobacterium</i> spp
Muestra A	Positivo	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
Muestra B	Positivo	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
Muestra C	Positivo	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
Muestra D	Positivo	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
Muestra E	Negativo	<i>Microbacterium oleivorans</i>

¹Ver Figura 23 en Apéndice E

²Ver secuencias en Apéndice I

Figura 10 Determinación de virulencia de bacterias inoculadas en plántulas de tomate a los 20 días después de la inoculación.



	Control negativo	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 4	Muestra 5	Muestra A	Muestra B	Muestra C	Muestra D	Muestra E
No virulencia	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
Hipovirulencia	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	13.3	13.3	26.7	33.3	0.0
Virulencia	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	86.7	86.7	73.3	66.7	0.0

Figura 11 Porcentaje de plántulas de tomate que manifestaron daño severo “muerte” a los 20 días después de la inoculación con bacterias.

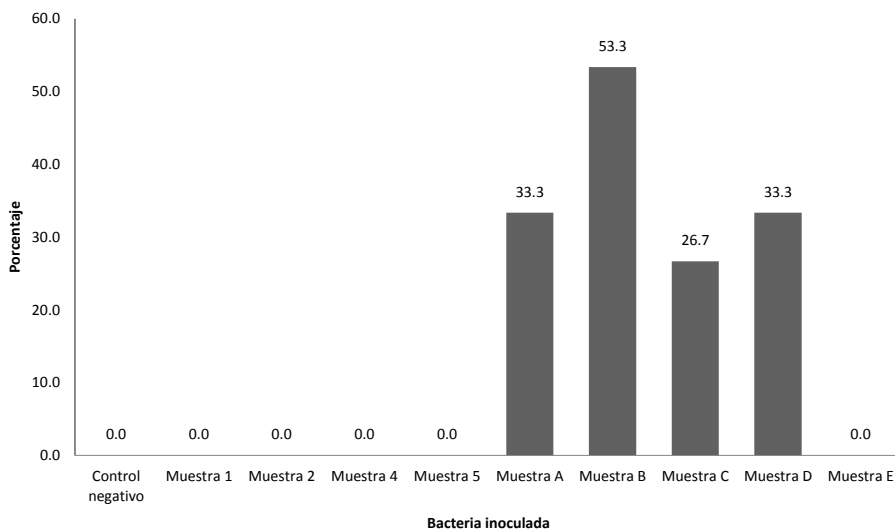


Figura 12. Comparación del nivel de severidad (escala de 0 a 5) ocasionada por bacterias inoculadas en plántulas de tomate respecto al tratamiento.

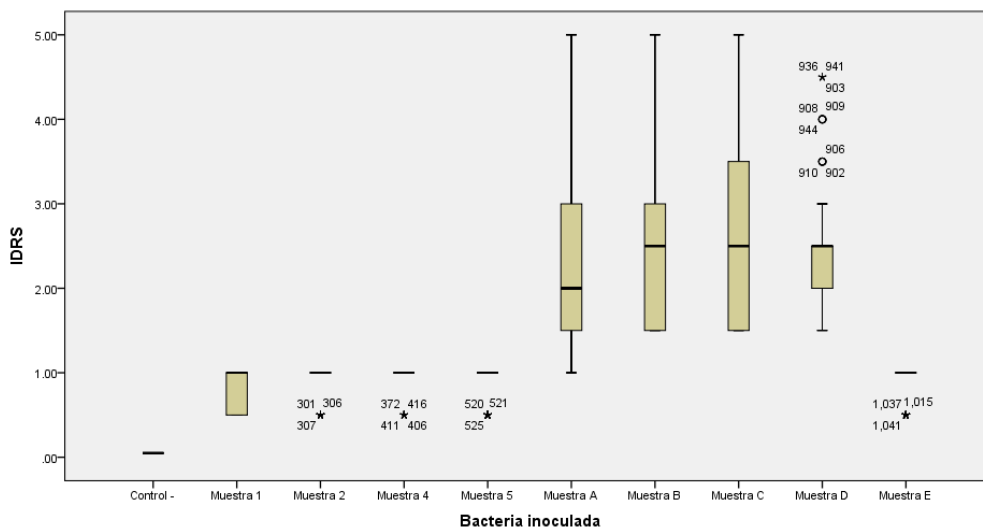
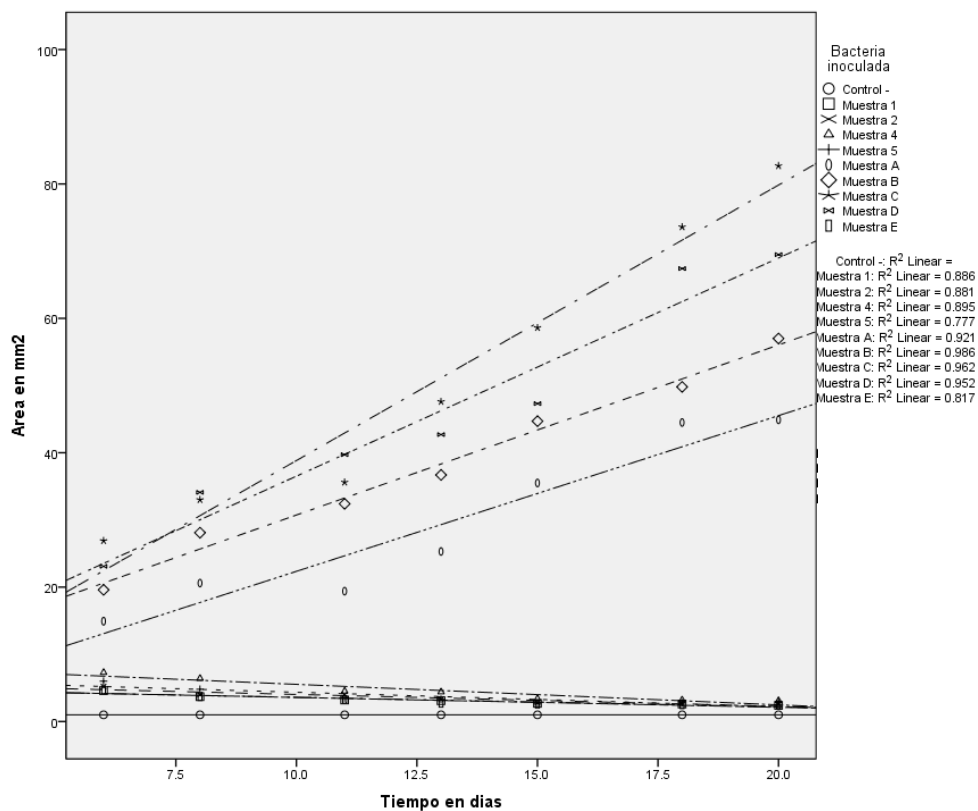


Figura 13 Comparación de área de lesión ocasionada por bacterias inoculadas en plántulas de tomate respecto al tiempo.



Cuadro 5. Diagnóstico de la enfermedad ocasionada a plantas infectadas.

ID	Prueba Inmunostrip dirigido a <i>Cmm</i>	¹ PCR dirigido a Plásmido pCM1 con iniciadores Cm3-Cm4	PCR dirigido a Plásmido pCM2 con iniciadores CMM5-CMM6
Muestra 1	Negativo	Negativo	Negativo
Muestra 2	Negativo	Negativo	Negativo
Muestra 4	Negativo	Negativo	Negativo
Muestra 5	Negativo	Negativo	Negativo
Muestra A	Positivo	Positivo	Positivo
Muestra B	Positivo	Positivo	Positivo
Muestra C	Positivo	Positivo	Positivo
Muestra D	Positivo	Positivo	Positivo
Muestra E	Negativo	Negativo	Negativo

¹Ver Figura 27 y Figura 28 en el Apéndice G

IV. DISCUSIÓN

A. Extracción de bacteria a partir de semilla y planta de tomate.

Las semillas de tomate son consideradas como los principales focos de infección en los brotes de la enfermedad del cáncer bacteriano, el lote de semilla analizado estuvo asociado con un brote de *Cmm* registrado en 2009-2010. Dado a su escasez, se utilizó en pequeñas cantidades, muy por debajo de las recomendadas por organismos internacionales como la EPPO o la ISHI. El procedimiento, en general mostró ser complicado, pues se obtuvieron indiscriminadamente diferentes colonias amarillas muy similares a *Cmm*, de las cuales fueron seleccionadas aquellas que se asemejaban más a la morfología de bacilo Gram positivo y cuyas colonias fueran de apariencia mucoide.

La planta de tomate analizada era procedente del municipio de Monjas, Jalapa, esta planta manifestaba la sintomatología típica de la enfermedad del cáncer bacteriano, es decir, necrosis en el tallo, cuyo corte longitudinal mostró taponamiento del tejido vascular (ver Figura 14B del Apéndice A). Las hojas mostraron manchas necróticas y marchitez severa, como se muestra en la Figura 14A del Apéndice A. Esta planta fue diagnosticada con la presencia de *Cmm* mediante la técnica de PCR, y la prueba inmunostrip dirigida contra *Cmm*. En el proceso de aislamiento, se observó que a los 3 días de incubación, las placas de medio no selectivo NBY que contenían la extracción del tallo estaban repletas de colonias de *Pseudomonas* y bacterias saprófitas, esto indica que el aislamiento de *Cmm* puede ser inhibido o resulta ser dificultoso por su lento crecimiento, razón por la cual no se recomienda su aislamiento a partir de medios generales. En tanto, los aislamientos realizados en la parte foliar sintomática no contenía tanta carga bacteriana como el tallo, y se observó que a partir del día 7 de incubación, crecieron pequeñas colonias redondas de color amarillo sobre medio semiselectivo D₂ANX. Estas mismas colonias fueron observadas en el aislamiento del tallo, pero crecieron con mayor dificultad debido a la presencia de otras colonias, lo cual dificultó su recuperación.

La Figura 15 del Apéndice A, muestra el crecimiento de colonias de bacterias tanto en medio semiselectivo como en no selectivo, acá se aprecia el crecimiento desmesurado y la diversidad de colonias en medio no selectivo, en todas las diluciones. Sin embargo, en el medio semiselectivo D₂ANX se observó principalmente el crecimiento de bacterias Gram positivo. La Figura 16 del apéndice A, muestra como lucen las colonias típicas de *Cmm* en medio semiselectivo D₂ANX, nótese que las colonias corresponden a la morfología típica de *Cmm*, es decir, redondas, convexas y amarillas.

B. Caracterización microbiológica y molecular de las bacterias aisladas.

En el Cuadro 1 se muestra que todas las bacterias seleccionadas tanto de semillas como de planta, tienen características en común como: tinción Gram positivo, colonias color amarillo, apariencia mucóide y forma de bacilo. Esto indica la diversidad de colonias que pueden obtenerse y asociarse con *Cmm*, la Figura 17 del Apéndice B muestra cómo lucen estas colonias en medio semiselectivo y sus características microscópicas en un aumento de 1000 veces. De todo esto se infiere que no se puede realizar un diagnóstico simplemente basado en características de crecimiento y morfología, razón por la cual es necesario realizar la caracterización molecular por ser específica y sensible.

Las pruebas inmunostrip *Cmm* de la casa comercial Agdia[®], se utilizan rutinariamente como pruebas de diagnóstico rápido, y su aplicación se realiza sobre todo en plantas de tomate con sintomatología de la enfermedad del cáncer bacteriano, no obstante, en esta investigación se utilizó para diagnosticar la bacteria en cultivo puro, y se demostró la precisión de resultados en bacterias que más adelante fueron identificadas como *Cmm*. El Cuadro 3 muestra que bacterias aisladas de semillas de tomate y una que fue aislada de planta fueron negativas a esta prueba, mientras que cuatro bacterias que fueron aisladas de planta de tomate sintomática dieron positivo. El diagnóstico de *Cmm* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) dirigida hacia los plásmidos pCM1 y pCM2, mostró que bacterias identificadas como muestra A hasta la muestra D, fueron positivas para el plásmido pCM1, mientras que para el plásmido pCM2 solo fueron positivas las

muestras A y C, ver Figura 18 y 19 del Apéndice C. En las pruebas de diagnóstico rutinarias de PCR dirigido a los plásmidos pCM1/pCM2, se considera que la detección de los dos plásmidos o al menos el primero (pCM1) ya se puede considerar como “positiva” a la muestra. Ambos resultados, tanto de la PCR como de inmunostrip fueron consistentes para el diagnóstico de *Cmm*.

C. Análisis de la secuencia del gen 16S ADNr.

El análisis de la secuencia de la región 16S del ADN ribosomal es considerada como una técnica de diagnóstico muy específica y de gran utilidad. La Figura 18 y 19 del Apéndice C, muestran las bandas correspondientes a la región 16S ADNr analizada para cada bacteria, sin embargo, para el análisis de la secuencia se requirió la purificación de los productos de PCR. La Figura 20 del apéndice B muestra las bandas purificadas previo a la secuenciación, donde se aprecia el tamaño esperado de la región a analizar, es decir, aproximadamente 800 bp (pares de base). En el análisis de la secuencia, se encontró que las muestras A, B, C y D correspondieron en un 100% de identidad con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, lo cual fue congruente a los resultados obtenidos con PCR e inmunostrip. La muestra E fue identificada como *Microbacterium* spp. En tanto, las bacterias aisladas a partir de semilla de tomate mostraron una identidad del 99% con las bacterias *Micrococcus* spp para el caso de la muestra 1 y *Curtobacterium* spp para las muestras 2, 4 y 5. El Cuadro 5 resume esos resultados y el Apéndice I muestra las secuencias consenso de cada bacteria y su búsqueda en la base de datos (GenBank) del NCBI. Las bacterias de los géneros *Micrococcus* spp, *Curtobacterium* spp y *Microbacterium* spp están asociadas al suelo y se les considera saprofitas, sin embargo pueden encontrarse en el tallo de las plantas sin causar algún daño.

D. Respuesta hipersensible en planta indicadora.

En esta investigación se introdujo el uso de la planta indicadora *Mirabilis jalapa*, conocida comúnmente como “flor maravilla”. El Cuadro 4 y Figura 23 del Apéndice E muestran que bacterias que fueron positivas para *Cmm* por PCR e inmunostrip mostraron respuesta hipersensible en la planta indicadora, mientras tanto, las demás bacterias, a

pesar de ser bacilos Gram positivos o coco Gram positivo como en el caso de la muestra 1 (*Micrococcus* spp), no mostraron ningún indicio de daño o necrosis en las hojas inoculadas, es más, son muy similares al control negativo. A este respecto, se hace notar que *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causa un daño tisular severo en el área de inoculación, es decir una necrosis que apareció en un tiempo relativamente corto de 24 horas bajo las condiciones descritas en la metodología. Esto indica que el uso de plantas indicadoras puede ser empleado como una herramienta más de diagnóstico de *Cmm*, cuyos resultados mostraron ser similares a las técnicas de diagnóstico rutinarias.

E. Ensayo de patogenicidad en plántulas de tomate.

Este ensayo fue realizado con el propósito de evaluar la progresión de la enfermedad y la intensidad en que ésta se manifestaba durante el período de observación de 20 días. La severidad fue evaluada mediante la medición del área de lesión planta por planta y por medio de la ponderación de la progresión de la enfermedad mediante una escala de 0 a 5. Las evaluaciones de severidad iniciaron 6 días después de la inoculación, donde se empezó a observar un tipo de clorosis en el área de inoculación de las plantas. En la Figura 24 del Apéndice F, se observa la aparición de lesiones cloróticas con necrosis leve en las plantas que fueron inoculadas con bacterias identificadas como muestras A, B, C y D que corresponden todas a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Estas lesiones fueron ponderadas con la puntuación individual de la enfermedad (IDRS) con valores de 1.5, debido a que todas manifestaron necrosis severa, con un leve indicio de cáncer. Las muestras 1, 2, 4, 5 y E que corresponden a las bacterias enlistadas en el Cuadro 4 fueron ponderadas con la escala IDRS con valores de 0.5 y 1, por sólo mostrar una leve necrosis y el control fue ponderado con 0 por no mostrar lesión.

Once días después de la inoculación, las plantas inoculadas con *Cmm* (muestras A, B, C y D) ya manifiestan lesiones con necrosis severa y cáncer bacteriano (ver Figura 25 del Apéndice F), el cual fue apreciado como una división del tallo que se expande hacia arriba y hacia abajo del área de inoculación. Estas lesiones fueron ponderadas por

ejemplo, con un IDRS de 2.5. Mientras que las muestras 1, 2, 4, 5 y E se conservaron con un IDRS entre 0.5 y 1.

En la Figura 26 del Apéndice F, se aprecia cómo se observaron las plantas al finalizar el período de 20 días. En el caso de las plantas que fueron inoculadas con las muestras A y B, se aprecia marchitez total de la planta, afectando a las 3 hojas verdaderas y cáncer severo en el tallo que se extiende hacia arriba. Estas plantas fueron ponderadas con el valor máximo de IDRS que es 5. Las plantas que mostraron marchitez severa solo de la primera hoja fueron ponderadas con valores de IDRS de 3.5, como en el caso de la muestra C y D. Las plantas inoculadas con las muestras 1, 2, 4, 5 y E no mostraron necrosis, cáncer, ni marchitez en ningún área de la planta, por lo tanto se mantuvieron con valores de IDRS entre 0.5 y 1. Al finalizar el período de observación también se hace notar que las plantas control inoculadas con agua estéril no mostraron ningún síntoma y sanaron.

La Figura 10 muestra el carácter patogénico o la capacidad que tienen las bacterias de causar la enfermedad del cáncer bacteriano del tomate, ésta se muestra en porcentajes de virulencia, en dicha figura se hace notar que aquellas plantas que fueron inoculadas con las muestras A, B, C y D que corresponden a *Cmm* mostraron diferentes niveles de virulencia, por ejemplo, en el caso de las muestras A y B manifestaron 86.7% de virulencia, mientras las muestras C y D mostraron una virulencia de 73.3 y 66.7% respectivamente. Las bacterias de las muestras C y D, mostraron los valores de hipovirulencia más altos respecto a las otras, en otras palabras, 26.7 y 33.3% de las plantas inoculadas con éstas manifestaron síntomas de cáncer bacteriano localizado en el tallo. Todas las demás muestras de bacterias, 1, 2, 4, 5 y E mostraron no ser virulentas.

Al final del periodo de observación, también se notó el porcentaje de daño severo “muerte” que las plantas inoculadas manifestaron. Este dato aporta información sobre la intensidad en que se manifestó la enfermedad. La Figura 11 muestra que más del 50% de las plantas inoculadas con la bacteria de la muestra B mostraron síntomas severos de la enfermedad a los 20 días. En tanto las demás bacterias de las muestras A, C y D causaron

daño severo a 1/3 de las plantas inoculadas. No hay ningún daño reportado para las demás bacterias. Esta leve diferencia en el daño causado, puede ser debido a variaciones de las plantas o diferencias en la cantidad de inóculo aplicado.

La Figura 12 muestra la evaluación de la severidad con la puntuación individual de la enfermedad (IDRS), donde se aprecia que las muestras 1, 2, 4, 5 y E obtuvieron valores promedios de IDRS cercanos a 1 durante los 20 días, con desviaciones estándar pequeñas. Las plántulas de tomate inoculados con las muestras A, B, C, y D muestran en promedio valores de IDRS cercanos a 2.5. Esto permite visualizar que las muestra A, B y C obtuvieron marchitez en las hojas verdaderas, muestras que la muestra D manifestó en su mayoría el síntoma de cáncer severo en el tallo. Para el caso de las plantas inoculadas con *Cmm* (muestras A, B, C y D) se observa incremento en la severidad conforme transcurre el tiempo. Mientras que las plantas inoculadas con las demás bacterias se mantienen constantes o disminuyen respecto el tiempo.

La segunda medición de severidad consistió en estimar si había diferencia significativa entre los tratamientos, basado en el área de lesión que ocasionó cada bacteria en las plantas inoculadas. Según el análisis estadístico de medias independientes de Kruskal Wallis descrito en el Apéndice E, se encontró con un nivel de confianza de 95% que sí hay diferencia significativa entre el daño ocasionado por las bacterias aisladas a partir de semillas y las que se aislaron de planta de tomate, específicamente las muestras A, B, C y D que corresponden a *Cmm*. La pos-prueba de Dunn indicó que en los 20 días no hay diferencia significativa entre la severidad mostrada entre las bacterias que corresponden a las muestras A, B, C y D. Sin embargo, sí la hay entre aquellas bacterias que corresponden a *Clavibacter michiganensis* subps. *michiganensis* y las que pertenecen a *Curtobacterium* spp, *Microbacterium* spp y *Micrococcus* spp.

La Figura 13 muestra un diagrama de dispersión y regresión lineal donde se compara el área de lesión ocasionada por la bacteria respecto al tiempo. La tendencia general, muestra que el área de lesión es proporcional al tiempo para el caso de las plantas que fueron inoculadas con *Cmm*. Mientras que aquellas que fueron inoculadas con

Micrococcus spp, *Microbacterium* spp y *Curtobacterium* spp la tendencia es inversamente proporcional. Esto una vez más demuestra el carácter patogénico de *Cmm* comparado con otras bacterias de la misma familia.

F. Diagnóstico del cáncer bacteriano del tomate en las plántulas infectados.

Luego del ensayo de patogenicidad, se verificó que realmente las bacterias inoculadas, en el caso de las muestras A, B, C y D correspondieran a *Cmm*, razón por la cual fue realizado la extracción de ADN genómico de las plantas y se realizó el diagnóstico mediante PCR dirigido a los plásmidos pCM1 y pCM2. El Cuadro 5 muestra los resultados del diagnóstico de la enfermedad del cáncer bacteriano por medio de inmunostrip dirigido a *Cmm* y la prueba molecular PCR, nótese que en este caso todas las muestras A, B, C y D dieron positivo para ambos plásmidos de *Cmm*, lo cual es congruente con los resultados obtenidos con la virulencia y severidad, ya que se asocia la manifestación de marchitez en hojas con el segundo plásmido (pCM2). La Figura 27 y 28 del Apéndice G, muestran la visualización de los productos de PCR de todas las muestras analizadas, en la Figura 27 no se observa ninguna banda para las bacterias que corresponden a las muestras 1, 2,4, 5 y E, y en la Figura 28 se observan los tamaños esperados de las bandas que corresponden a los productos de PCR de los iniciadores Cm3-Cm4, que es 635 bp, y 614 bp en el caso de los iniciadores CMM5-CMM6.

Por otro lado, también se llevaron a cabo cortes longitudinales en la sección del tallo donde se inoculó la bacteria con la finalidad de comparar el daño mecánico ocasionado y la lesión causada por la enfermedad del cáncer bacteriano. En la Figura 29 del apéndice H se muestran estas lesiones. Nótese que la planta control (-) sufrió un pequeño daño mecánico, pero sus células vasculares se encuentran intactas. En las plantas que fueron inoculadas con *Micrococcus* spp, *Curtobacterium* spp y *Microbacterium* spp se manifestó una leve necrosis interna que afectó a un número limitado de células. Por el contrario, en las plantas que fueron inoculadas con *Cmm*, se notó la presencia de células totalmente destruidas, donde se observó necrosis y muerte celular ocasionada por el cáncer. Cabe

resaltar que esta sintomatología se observó a lo largo de casi todo el tallo, es decir, no se limitó al área de inoculación, sino que también hubo migración hacia arriba y hacia abajo.

V. CONCLUSIONES

- A. El lote de semilla de tomate analizado mostró diferentes bacterias similares a *Cmm*, en morfología y características de colonias, pero ninguna fue positiva para las pruebas inmunostrip, PCR, respuesta hipersensible y el ensayo de patogenicidad. Sin embargo, habrá que realizar otras metodologías de aislamiento o aumentar el número de muestras para que el análisis sea más significativo.
- B. Utilizando el medio semiselectivo D₂ANX fue posible aislar *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a partir de la planta sintomática.
- C. Las bacterias aisladas de planta sintomática de tomate, identificadas como muestras A, B, C y D, fueron positivas para la prueba rápida inmunostrip, PCR dirigidos a los plásmidos pCM1 y en algunos casos se detectó el plásmido pCM2.
- D. El análisis de la secuencia del gen 16S ADNr reveló que la identidad de las muestras 1, 2, 4, 5 y E fue; *Micrococcus* spp, *Curtobacterium* spp, *Curtobacterium* spp, *Curtobacterium* spp y *Microbacterium oleivorans* respectivamente. Mientras tanto, las muestras A, B, C y D todas fueron identificadas como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.
- E. La planta indicadora *Mirabilis jalapa* mostró respuesta hipersensible al ser inoculada con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, mostrando necrosis severa en el área de inoculación a las 24 horas después de la infiltración bacteriana.
- F. Las bacterias similares a *Cmm* aisladas de semillas de tomate no mostraron respuesta hipersensible en *Mirabilis jalapa*, esto a pesar de ser Gram positivas, lo cual indica que no son patogénicas y confirma que la planta indicadora es selectiva en la respuesta con las bacterias patógenas.

- G. Las plántulas de tomate de 4 semanas de edad de una variedad comercial fueron infectados en un 100% con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, ya que se logró observar los diferentes síntomas de la enfermedad del cáncer bacteriano.
- H. Las plántulas de tomate que fueron inoculados con las bacterias similares a *Cmm* (*Micrococcus* spp *Curtobacterium* spp y *Microbacterium* spp), no manifestaron ningún síntoma característico de la enfermedad del cáncer bacteriano.
- I. A los 20 días de concluido el bioensayo, se apreció que entre la bacterias de *Cmm* las muestras A y B mostraron carácter más virulento que las muestras C y D. Posiblemente esta mínima diferencia se deba a las diferencias genéticas individuales de cada planta o variaciones en el inóculo.
- J. La puntuación individual de la enfermedad (IDRS) mostró ser un sistema adecuado para la medición de severidad, mediante éste se demostró que todas las plantas inoculadas con *Cmm* mostraron al menos síntomas de cáncer bacteriano en el tallo, y en algunos casos se observó marchitez de las tres hojas verdaderas. Ninguna de las plántulas de tomate inoculados *Micrococcus* spp, *Curtobacterium* spp y *Microbacterium* spp mostró una puntuación mayor a uno, lo que significa que en el peor de los casos se ocasionó una necrosis leve que en el transcurso del tiempo fue desapareciendo.
- K. La comparación del área de lesión respecto al tiempo de inoculación, demostró una relación directamente proporcional entre ambas variables, para el caso de las plantas que fueron inoculadas con *Cmm*. Las demás mostraron una tendencia casi constante.
- L. El análisis estadístico mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis mostró con un nivel de confianza del 95% que hay diferencia significativa de

severidad entre bacterias inoculadas. La pos-prueba de Dunn mostró que la severidad ocasionada por *Cmm* tuvo diferencia significativa comparada con la manifestada por *Micrococcus* spp, *Curtobacterium* spp y *Microbacterium* spp. Una cepa de *Curtobacterium* spp (muestra 4) no mostró diferencia respecto a una cepa de *Cmm* que pertenece a las muestras A y B. Esto se debe principalmente a que estas cepas causaron lesiones relativamente pequeñas en el tallo, aunque cabe resaltar que sí se observó que afectaron hojas, lo cual no fue tomado en cuenta en el área de lesión.

- M. Las plantas que manifestaron los síntomas característicos de la enfermedad del cáncer bacteriano, fueron diagnosticadas como positivas mediante la prueba inmunostrip y PCR dirigidos a los plásmidos pCM1 y pCM2, así mismo, un corte longitudinal en el tallo mostró muerte celular en los tejidos vasculares que se extendían hacia arriba y hacia abajo del área de inoculación.

VI. RECOMENDACIONES

- A. Se recomienda que la extracción y aislamiento de *Cmm* sea realizado en las hojas que muestren síntomas de marchitez y necrosis, ya que es un área menos susceptible a contaminación.
- B. De ser posible, el aislamiento de *Cmm* debe llevarse a cabo en medio semiselectivos D₂ANX o CMM-1, ya que las colonias manifiestan un crecimiento lento y se hacen notar hasta los 7 días de incubación a 28 °C y oscuridad.
- C. Llevar a cabo estudios donde se comparen diferentes cepas de *Cmm* aisladas de diferentes plantas de tomate (variedades) en diferentes localidades de Guatemala.
- D. Tomar en cuenta que en esta tesis se utilizó un número limitado de semillas de tomate y de un único lote. Los organismos internacionales como la EPPO y la ISHI recomiendan utilizar sub-muestras de al menos 5000 semillas.
- E. En estudios posteriores se recomienda aislar de diferentes lotes y en cantidades más grandes de semillas o germinar plántulas para su posterior análisis.
- F. Realizar al menos dos pruebas de caracterización de *Cmm* para dar como positiva a una muestra que manifieste los síntomas de la enfermedad del cáncer bacteriano. Se recomienda la prueba de PCR e inmunostrip dirigido contra *Cmm*.
- G. El uso de la planta indicadora *Mirabilis jalapa* mostró ser una herramienta útil para determinar si una bacteria Gram positiva presuntamente *Cmm* es patógena mediante la respuesta hipersensible. Se recomienda utilizarla si se tiene a disposición.

- H. Emplear más bacterias bacilo Gram positivo aisladas a partir de semilla de tomate para evaluar su patogenicidad en plántulas de tomate.
- I. Estudiar asociaciones entre las bacterias “saprófitas” o “no virulentas” y *Cmm* para evaluar cómo se afecta la virulencia en una planta, puede darse algún caso de sinergia microbiana. Para lo cual se recomienda realizar co-inoculaciones en plantas de tomate.
- J. Por ser más práctico y sencillo de aplicar, se recomienda la evaluación de los síntomas de la enfermedad del cáncer bacteriano con la escala de 0 a 5 de la puntuación individual de la enfermedad (IDRS). Los resultados obtenidos fueron comparables con los observados utilizando mediciones de área de lesión en tallo.
- K. Realizar las pruebas de bioensayo y de caracterización molecular con cepas controles de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* para tener resultados comparativos. En este estudio no se utilizó ninguna cepa control, por tratarse de una bacteria cuarentenada y hasta ahora no descrita en Guatemala.
- L. Los resultados obtenidos con las pruebas rápidas inmunostrip de la casa comercial Agdia[®], los PCRs dirigidos a los plásmidos pCM1, pCM2, la respuesta hipersensible y la secuenciación en la región 16S ADNr fueron comparables y consistentes, por lo que se recomiendan para el diagnóstico de la enfermedad del cáncer bacteriano.

VII. LITERATURA CITADA

- Agrios, George. 2005. *Plant pathology*. 5 edición. Elsevier Academic Press. United States of America. 948 pp.
- Altman, D., D. Machin, T. Bryant, M. Gardner, 2005. *Statistics with confidence*. 2a edición. BMJ Books. 252 pp.
- Alvarez, A. & W. Kaneshiro. 2005. *Virulence in bacterial plant pathogens: significance in diversity of populations that cause bacterial canker of tomato*. Department of plant and environmental protection sciences University of Hawaii. Pp. 1–3.
- Anderson, D., D. Sweeney y T. Willians. 2004. *Estadística para la administración y economía*. Octava edición. International Thomson Editores S.A. 949 pp.
- Burokiene, D. 2006. *Early detection of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis in tomato seedling*. Agronomy Research 4:151–1154.
- Carlton, W., E. Braun and M. Gleason. 1998. *Ingress of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis into tomato leaves through hydrathodes*. The American Phytopathological Society 88(6):525–529.
- Chang, R., S. Ries and K. Pataky. 1991. *Dissemination of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis by practices used to produce tomato transplants*. The American Phytopathological Society 81(10):1276–1281.

- Chang, R., S. Ries and K. Pataky. 1992. *Local source of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis in the development of bacterial canker on tomatoes*. The American Phytopathology Society 82(5):553–560.
- De Vries, R. and C. Stephens. 1997. *Response of first generation tomato somaclone progeny to Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. Plant Science 126:69–77.
- Dreier, J. A. Bermpohl and R. Eichenlaub. 1995. *Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. Phytopathology 85(4):462–468.
- Eichenlaub, R., K., H. Gartemann, and A. Burger. 2006. *Clavibacter michiganensis, a group of Gram-positive phytopathogenic bacteria*, Pp. 385–421. In: S. S. Gnanamanickam (ed.). Plant-Associated Bacteria. Springer Netherlands.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization. 2005. *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. EPPO Bull 35: 275–283.
- Fatmi, M., N. W. Shaad, and H. A. Bolkan. 1991. *Seed treatments for eradicating Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis from naturally infected tomato seeds*. Plant Dis. 75:383–385.
- Farrell, Robert. 2010. *ARN methodologies: A laboratory guide for isolation and characterization*. 4th Edition. Academic Press Elsevier. United State of America 717 pp.

Francis, D. and E. Kabelka 2001. *Resistance to bacterial canker in tomato (Lycopersicum hirsutum LA407) and its progeny derived from crosses to L. esculentum*. The American Phytopathological Society 85(11):1171–1176.

Gartemann, K., O. Kirchner, J. Engemann, I. Grafen, R. Eichenlaub and A. Buger. 2003. *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium*. Journal of Biotechnology 106:179–191.

-----; B. Abt, T. Bekel, A. Burger, *et al.* 2008. *The Genome Sequence of the Tomato-pathogenic actinomycete Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity*. Journal of Bacteriology 190(6):2138–2149.

Hadas, R., G. Kritzman, F. Kliezman, T. Gefen, and S. Manulis. 2005. *Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis in tomato seeds*. Plant Pathol. 54:643–649.

International Seed Federation. 2008. *Method for the detection of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis on tomato seed*. Disponible en el sitio web: <http://www.worldseed.org>.

-----, 2011. *Method for the detection of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis on tomato seed*. Disponible en el sitio web: <http://www.worldseed.org>.

- Jahr, H., A. Burger, J. Ahlemeyer, and R. Eichenlaub. 1999. *Interactions between Clavibacter michiganensis and its host plants*. Environ. Microbiol. 1:113–118.
- Janse, J. D. 2005. *Phytobacteriology principle and practice*. CABI publishing. United States of America. 366 pp.
- Kaneshiro, W., C. Mizumoto, and A. Alvarez. 2006. *Differentiation of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing*. European Journal of Plant Pathology 116:45–46.
- Kokoskova, B., I. Mraz, and J. Fousek. 2010. *Comparison of specificity and sensitivity of immunochemical and molecular techniques for determination of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. Folia Microbiol. 55(3):239–244.
- Lee, I., M. Bartoszyk, D. Gundersen-Rindal and R. Davis. 1997. *Phylogeny and Classification of Bacteria in the genera Clavibacter and Rathayibacter on the basis of 16S rRNA gene sequence analyses*. Applied and Environmental Microbiology 63(7):2631–2636.
- León, L., F. Siverio, y A. Rodríguez. 2006. *Detection of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis in tomato seeds using immunomagnetic separation*. Journal of Microbiological Methods 67:141–149.
- Meletzus, D., A. Bermphol, and R. Eichenlaub. 1993. *Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis NCPPB382*. Journal of Bacteriology 175(7):2131–2136.

- Milijasevic, S., B. Todorovic and J. Balaz. 2006. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Bacterial canker of tomato: Conventional and Molecular identification. Pestic. Phytomed. 21:185–192.
- Olivier, V., A. Baloche, A. Drouin, C. Audusseau, S. Paillard and H. Soubelet. 2010. Internal methods comparison study and inter-laboratory study on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. European and Mediterranean Plant Protection Organisation Bulletin 40. 248-256.
- Pastrik, K. and F. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. Journal of Phytopathology 147:687–693.
- Prensa Libre. 2010. *Difieren por origen de la bacteria del tomate*. Publicado el 21 de septiembre de 2010. Disponible en el sitio web: http://www.prensalibre.com/economia/Difieren-origen-bacteria-tomate_0_339566044.html.
- , 2010. *Bacteria causa pérdidas en tomate de exportación*. Publicado el 14 de septiembre de 2010. Disponible en el sitio web: http://www.prensalibre.com/economia/Bacteria-causa-perdidas-tomate-exportacion_0_335366465.html.
- , 2010. *Maga revisa cultivos de tomate*. Publicado el 25 de septiembre de 2010. Disponible en el sitio web: http://www.prensalibre.com/economia/Maga-revisa-cultivos-tomate-infectados_0_341965815.html.

- Umesha, S. P. Richardson, P. Kong, C. Hong. 2008. *A novel indicator plant to test the hypersensitivity of phytopathogenic bacteria*. *Journal of Microbiological Methods* 72:95–97.
- Werner, N., D. Fulbright, R. Podolsky, J. Bell and M. Hausbeck. 2002. *Limiting populations and spread of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis on seedling tomatoes in the greenhouse*. *The American Phytopathological Society* 86(5):535–542.
- Xu, X., S. Miller, F. Baysal-Gurel, K. Gartemann, R. Eichenlaub and G. Rajashekara. 2010. *Bioluminescence imaging of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis infection of tomato seeds in plants*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(12):3978–3988.

VIII. APÉNDICE

A. Extracción y aislamiento de *Cmm*.

Figura 14. Síntomas característicos de *Cmm* en planta sintomática.

Las hojas muestran manchas necróticas y marchitez severa. El tallo muestra taponamiento en los haces vasculares y áreas necróticas alrededor del xilema.

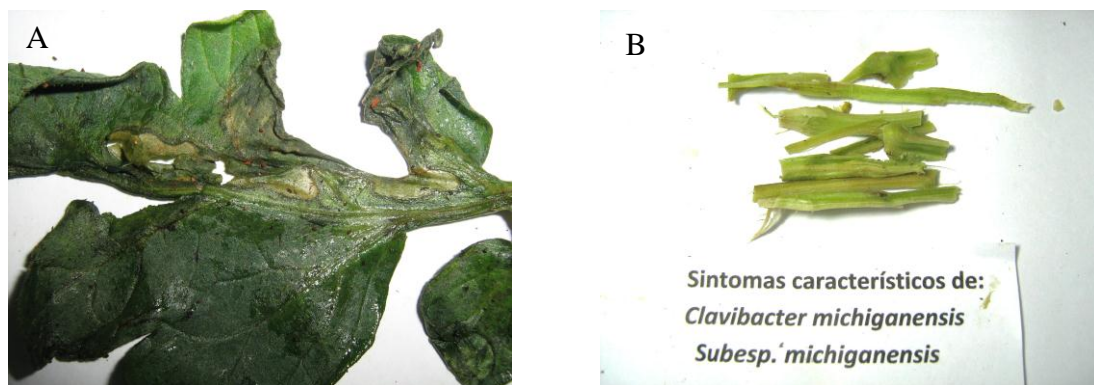


Figura 15. Aislamiento de *Cmm* en medios de cultivo.

Comparación de crecimiento de colonias de bacterias aisladas a partir de planta en medio no selectivo NBY y en medio semiselectivo D₂ANX a los 4 días de incubación.

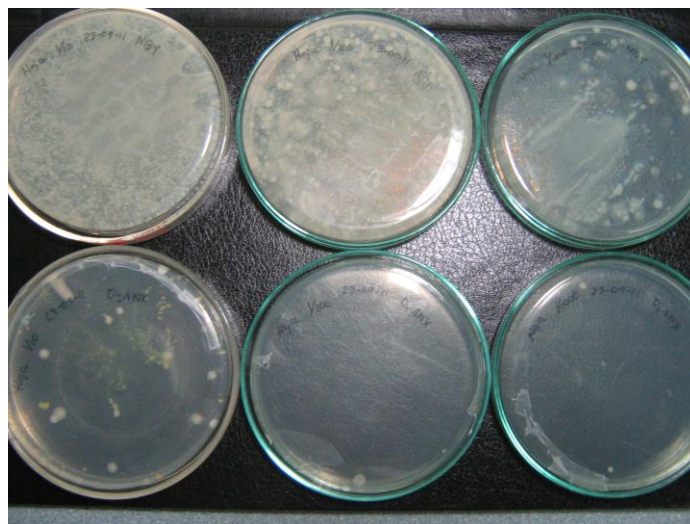
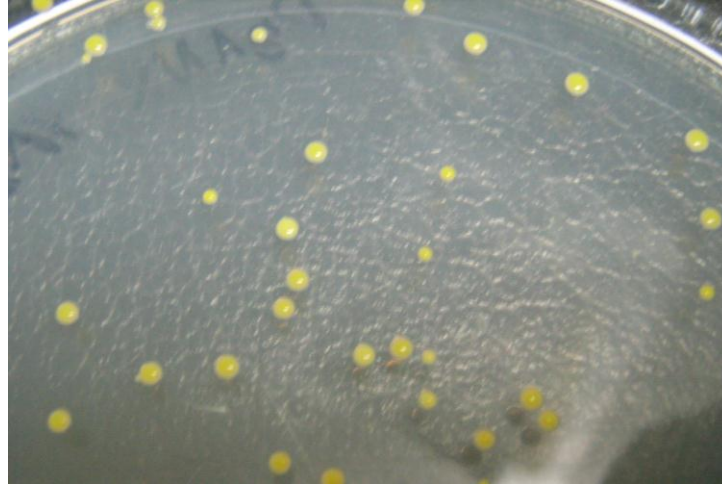


Figura 16. Colonias típicas de *Cmm* en medio semiselectivo.

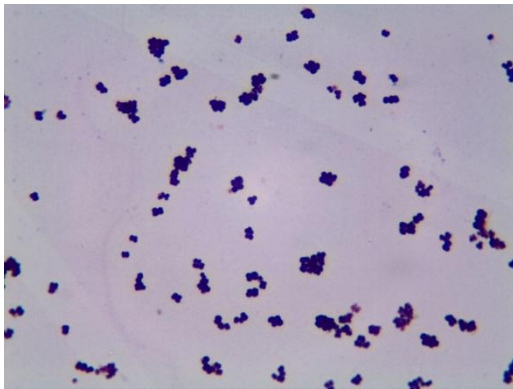
Crecimiento típico de colonias de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* sobre medio semiselectivo D₂ANX, a los 7 días de incubación a 28°C en oscuridad.



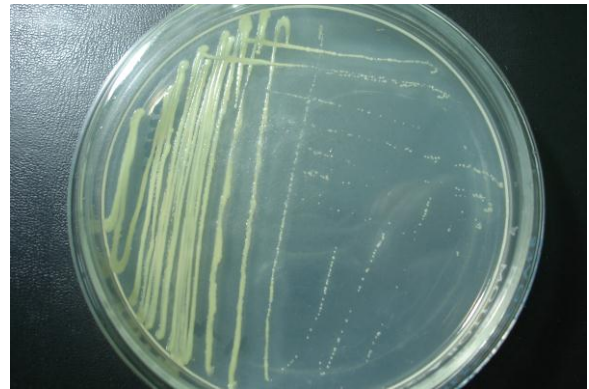
B. Caracterización morfológica de bacterias y colonias.

Figura 17. Características microbiológicas y morfológicas evaluadas.

Tinción de Gram, morfología de bacteria y patrón de crecimiento de las distintas bacterias aisladas a partir de semilla y planta de tomate.



Muestra 1, correspondiente a *Micrococcus* spp, estructura de coco Gram positivo.



Colonias redondas pequeñas, de color amarillo, no elevadas, ni mucoides.

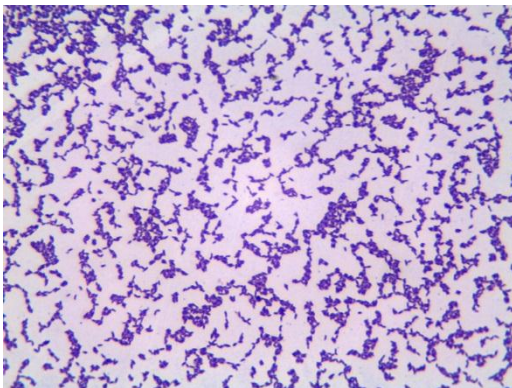
Continuación Figura 17



Muestra 2, correspondiente a *Curtobacterium* spp, estructura de bacilo Gram positivo.



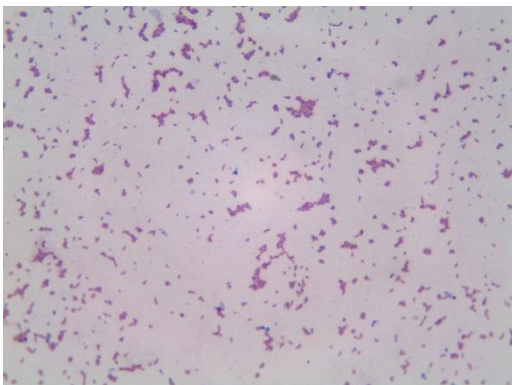
Colonias de color amarillo intenso, morfología irregular y apariencia mucoide.



Muestra 4, correspondiente a *Curtobacterium* spp, estructura de pequeños bacilos Gram positivo.



Colonias de color amarillo claro, morfología irregular, planas y mucoides.

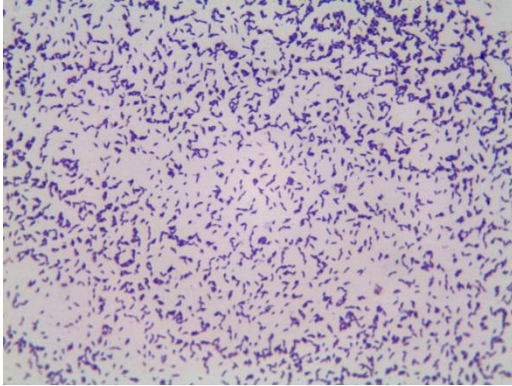


Muestra 5, correspondiente a *Curtobacterium* spp, estructura de cocobacilo Gram positivo.



Morfología irregular, de apariencia mucoide y color amarillo, colonias elevadas.

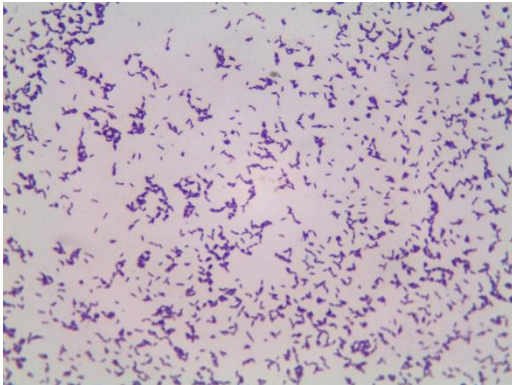
Continuación Figura 17



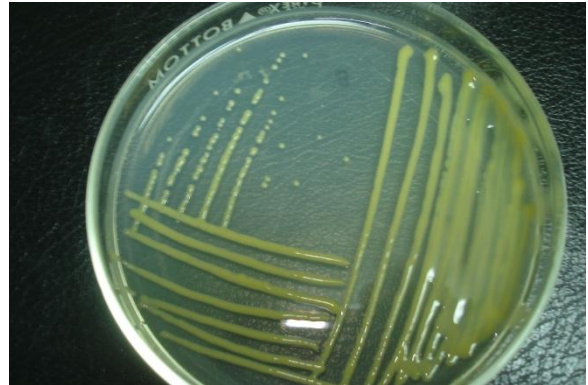
Muestra A, correspondiente a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, estructura de bacilo Gram positivo.



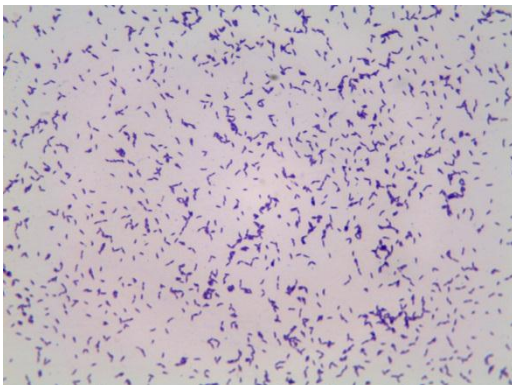
Colonias redondas, amarillas, convexas y mucoides.



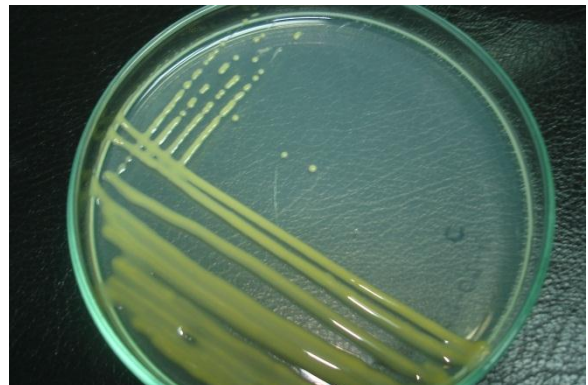
Muestra B, correspondiente a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, estructura de bacilo Gram positivo.



Colonias redondas, amarillas, convexas y mucoides.

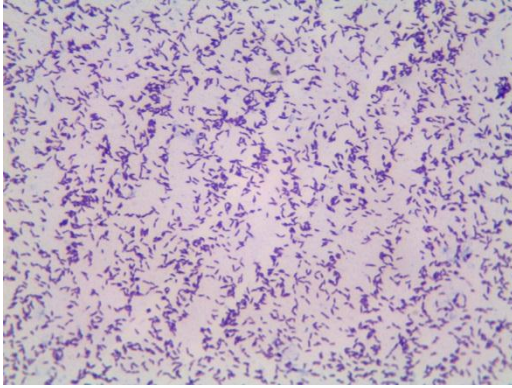


Muestra C, correspondiente a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, estructura de bacilo Gram positivo.

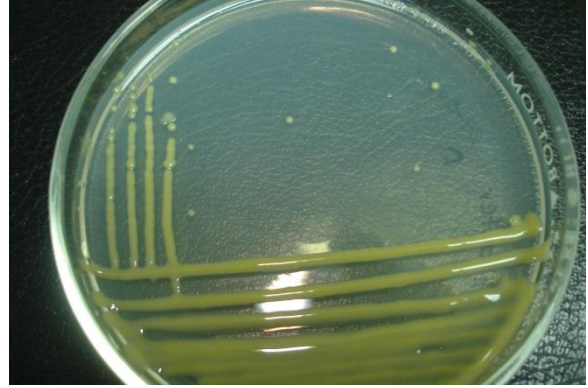


Colonias redondas, amarillas, convexas y mucoides.

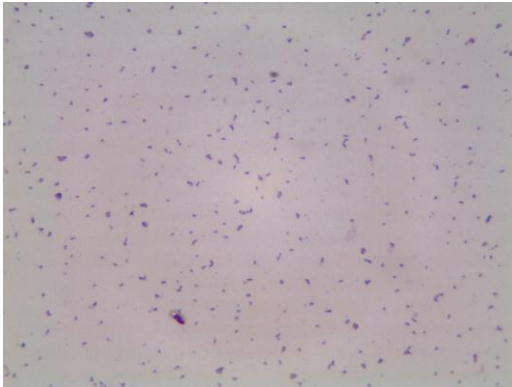
Continuación Figura 17



Muestra D, correspondiente a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, estructura de bacilo Gram positivo.



Colonias redondas, amarillas, convexas y mucoides.



Muestra E, correspondiente a *Microbacterium* spp, estructura de bacilo Gram positivo.



Colonias redondas, convexas, color amarillo-naranja y mucoides.

C. Caracterización molecular de bacterias aisladas.

Figura 18. Migración de los productos de PCR para caracterización molecular.

Gel de agarosa al 1% en TAE 1X para la visualización de los productos de PCR dirigido al gen 16S ADNr y a los plásmidos pCM1/pCM2 en bacterias aisladas a partir planta de tomate. Las letras representan las muestras de bacteria que fueron aisladas de planta, “C+” representa el control positivo de muestras de ADN de la cepa de *Cmm* A300. En el gel de arriba, las primeras 6 bandas son para la detección del gen 16S ADNr, con un tamaño estimado de 814 bp. Las segundas 6 bandas son para la detección del plásmido pCM1, con un tamaño esperado de 634 bp, y las últimas bandas corresponden al plásmidos pCM2 con un tamaño esperado de 614 bp.

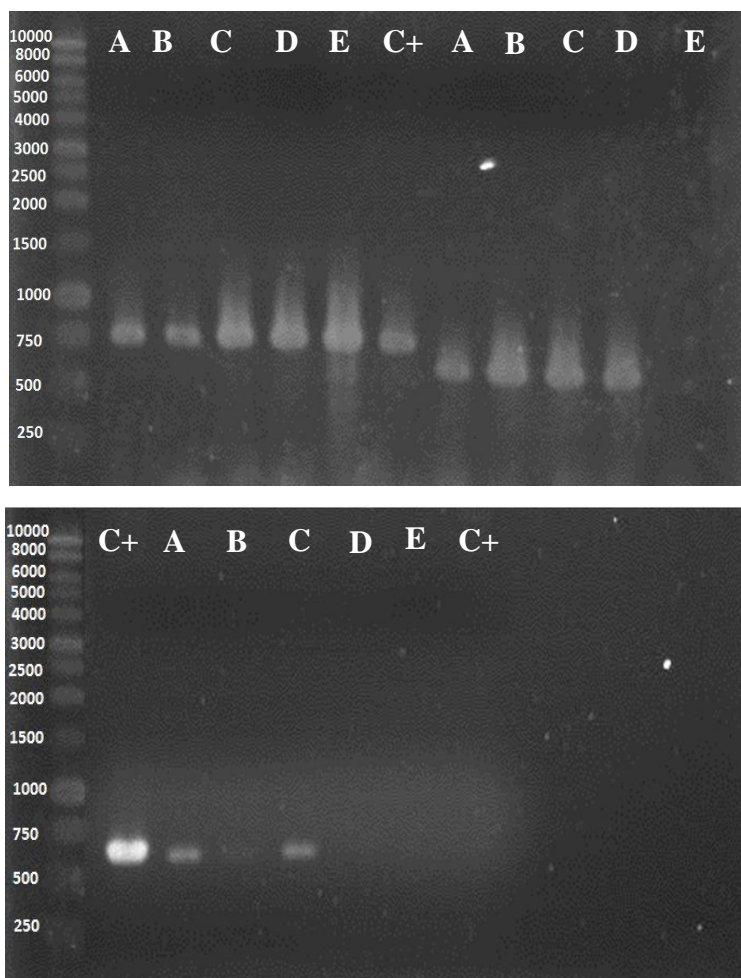


Figura 19. Migración de los productos de PCR para caracterización molecular.

Gel de agarosa al 1% en TAE 1X para la visualización de los productos de PCR dirigido al gen 16S ADNr y a los plásmidos pCM1/pCM2 en bacterias aisladas a partir semilla de tomate. Los números representan las muestras de bacteria que fueron aisladas de semilla, “C+” representa el control positivo de muestras de ADN de la cepa de *Cmm* A300. En el gel de arriba, las primeras 6 bandas son para la detección del plásmido pCM1, con un tamaño estimado de 634 bp. Las segundas 6 bandas son para la detección del plásmido pCM2, con un tamaño esperado de 614 bp, y las últimas bandas corresponden a la detección del gen 16S ADNr, con un tamaño esperado de 614 bp.

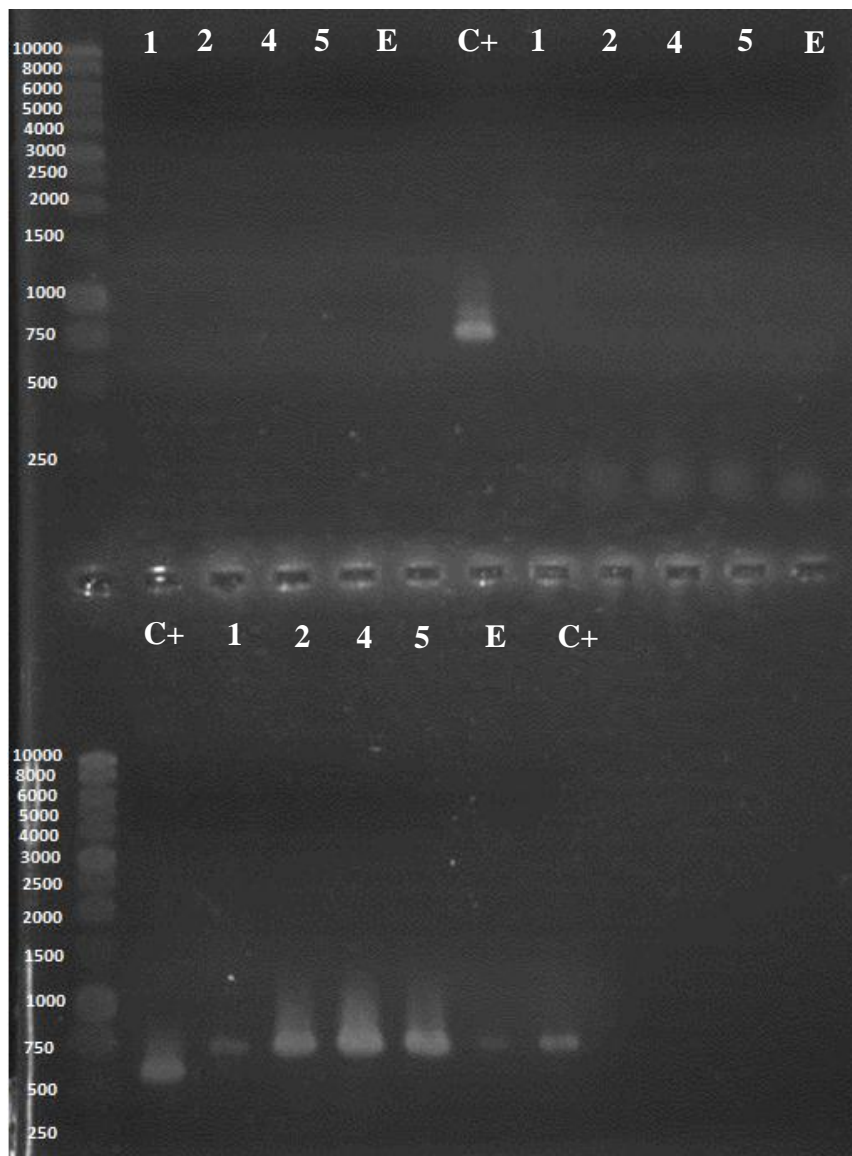


Figura 20. Migración de los productos de PCR para la detección del gen 16S ADNr. Gel de agarosa al 1% en TAE 1X para la visualización de los productos de PCR dirigido al gen 16S ADNr en bacterias aisladas a partir de semillas y planta de tomate. Orden de izquierda a derecha: Muestra A, muestra B, muestra C, muestra D, muestra E, muestra 1, muestra 2, muestra 4, muestra 5 y control (+) de ADN de la cepa de *Cmm* A300. Todas bandas ya fueron purificadas previo a la secuenciación.

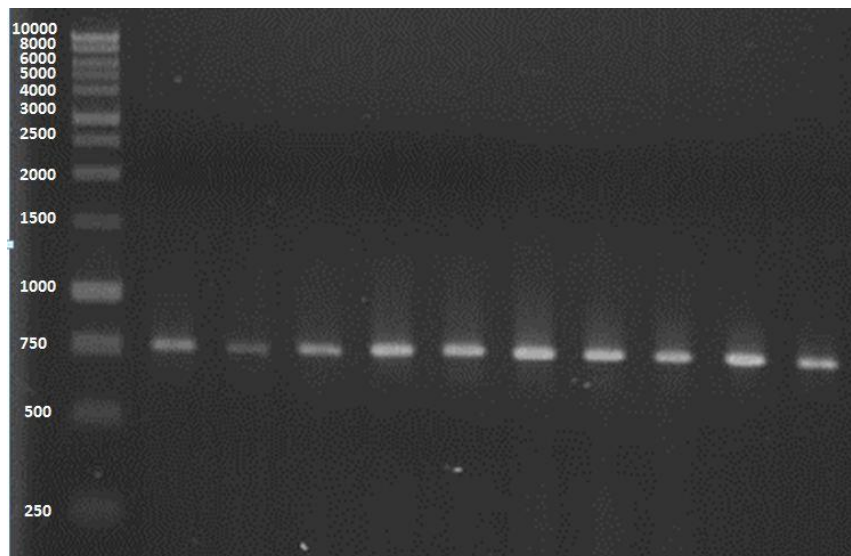
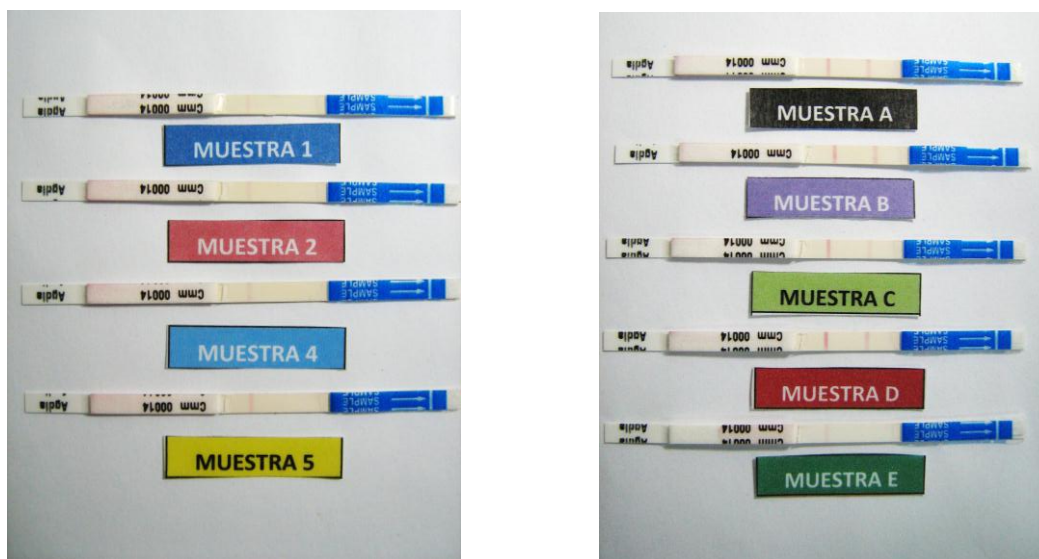


Figura 21. Pruebas rápidas inmunostrip dirigidos contra *Cmm*.

En la figura de la izquierda se muestra que ninguna de las pruebas fue positiva para las bacterias aisladas a partir de semilla de tomate. La línea rosada al extremo izquierdo indica el control de la prueba. En la figura derecha se muestran los resultados positivos para las muestras A a D, la cual es representada como una línea rosa que aparece en el extremo derecho. Notar que la muestra E fue negativo.



D. Cálculos estadísticos realizados

Se realizó análisis estadístico a las mediciones de área de lesión en función de las bacterias inoculadas (tratamiento) a los 20 días del período de observación. Primero se hizo la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para evaluar si las variables área de lesión y tratamiento se ajustaban a una distribución normal. El Cuadro 6 muestra el resultado de la prueba de normalidad, donde se observa que hay valores significantes menores a 0.05, por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta que los datos no tienen una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

Cuadro 6. Prueba de normalidad de Shapiro-Wilk para los datos de la variable área y tratamientos.

	Bacteria inoculada	Estadístico	gl	Sig.
Area en mm²	Muestra 1	.846	15	.015
	Muestra 2	.734	15	.001
	Muestra 4	.882	15	.050
	Muestra 5	.790	15	.003
	Muestra A	.966	15	.796
	Muestra B	.931	15	.279
	Muestra C	.978	15	.953
	Muestra D	.877	15	.042
	Muestra E	.630	15	.000

Dado a que no se tiene el supuesto de la distribución normal, se aplicó la inferencia estadística no paramétrica, en específico la prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación de las diferencias de la medias de los rangos de los tratamientos.

En esta prueba se evaluó las siguientes hipótesis:

H₀. Las medias de los rangos para cada tratamiento son iguales.

H_i. Las medias de los rangos para al menos dos tratamientos no son iguales.

En esta prueba no paramétrica, con un nivel de significancia del 0.05, se obtiene que sí hay diferencia significativa, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, el resumen de los datos estadísticos se observa en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Prueba de Kruskal Wallis.

Rangos			
	Bacteria inoculada	N	Media de rangos
Area en mm ²	Control -	15	8.50
	Muestra 1	15	41.57
	Muestra 2	15	53.57
	Muestra 4	15	66.50
	Muestra 5	15	55.17
	Muestra A	15	108.80
	Muestra B	15	116.13
	Muestra C	15	132.67
	Muestra D	15	124.40
	Muestra E	15	47.70
	Total	150	

Pruebas estadísticas ^{a,b}	
	Area en mm ²
Chi-Cuadrado	128.804
Df	9
Asymp. Sig.	.000
a. Prueba de Kruskal Wallis	
b. Variable de agrupamiento: Tratamiento	

Para la evaluación de cuáles tratamientos variaban significativamente entre sí, se realizó una pos-prueba llamada la prueba de Dunn,

Para esto, se calculó el valor de alfa ajustado

$$\alpha' = \frac{\alpha}{K(K-1)}$$

donde K es representó el número de tratamientos.

Como se trabajó con un nivel de significancia del 0.05, el alfa ajustado quedó como sigue:

$$\alpha' = \frac{0.05}{10(10-1)} = 0.00055$$

Luego se calculó el estadístico Z para ese nuevo valor de significancia, así:

$$1 - \alpha = 1 - 0.00055 = 0.9994$$

$$Z_{1-\alpha} = 3.2636$$

Posteriormente, se calculó la diferencia teórica entre tratamientos, utilizando el valor de Z , para lo cual se utilizó la formula siguiente:

$$\Delta_{ij} = Z_{1-\alpha} \sqrt{\frac{N(N+1)}{12} \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

donde N es el tamaño total de las muestras de los tratamiento, en este caso de los 10 tratamientos.

n_i y n_j es el tamaño de muestra de los dos grupos o tratamientos a comparar.

Dado a que el valor de N , es 150 y el número de muestra n fue el mismo para todos los tratamientos, entonces las diferencias teóricas deben ser las mismas, es decir **51.7**.

Utilizando los valores promedios de rangos, obtenidos de la prueba Kruskal Wallis se calculó las diferencias observadas del rango promedio para un tratamiento y para el otro, ver Cuadro 8. Así, la decisión fue la siguiente:

“Si el valor absoluto es mayor que la diferencia teórica correspondiente, entonces esa diferencia es significativa”.

Cuadro 8. Matriz de diferencias de medias de rango observadas entre tratamientos.

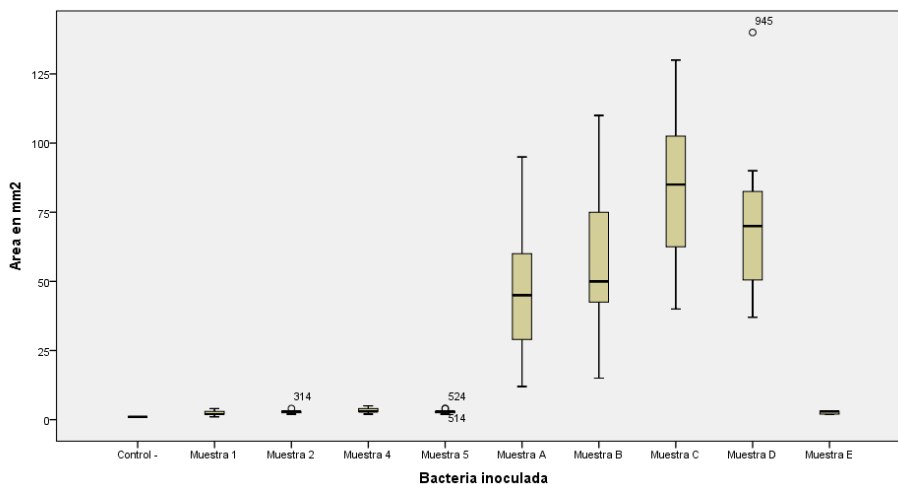
	Rj	41.6	53.6	66.5	55.2	108.8	116.1	132.7	124.4	47.7
Ri		M 1	M 2	M 4	M 5	M A	M B	M C	M D	M E
8.5	Control -	33.07	45.07	58	46.67	100.3	107.63	124.2	115.9	39.2
41.6	Muestra 1		12	24.93	13.6	67.23	74.56	91.13	82.83	6.13
53.6	Muestra 2			12.93	1.6	55.23	62.56	79.13	70.83	5.87
66.5	Muestra 4				11.33	42.3	49.63	66.2	57.9	18.8
55.2	Muestra 5					53.63	60.96	77.53	69.23	7.47
108.8	Muestra A						7.33	23.9	15.6	61.1
116.1	Muestra B							16.57	8.27	68.43
132.7	Muestra C								8.3	85
124.4	Muestra D									76.7

Los números marcados con negrita muestran la diferencia significativa con un nivel de confianza del 95% entre los tratamientos. Como conclusión, se observa que las bacterias de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causan una lesión mucho mayor que aquellas que fueron aisladas de semillas de tomate y éstas difieren significativamente con las demás, con una ligera excepción de la bacteria de la muestra 4.

La Figura 22 se muestra la distribución en diagrama de caja del área en función de los tratamientos realizados a los 20 días de estudio, en este se aprecia las respectivas lecturas de área de lesión registradas para cada tratamiento, nótese la diferencia de valores obtenidas entre cada tratamiento.

Figura 22. Diagrama de caja

Distribución de los datos de área de lesión en función de los tratamientos realizados



E. Respuesta hipersensible en planta indicadora (*Mirabilis jalapa*)

Figura 23. Respuesta hipersensible desarrollada en planta indicadora *Mirabilis jalapa* al ser inoculada con 9 bacterias distintas.



Muestra 1 (*Micrococcus* spp), inoculación de bacteria coco Gram positivo, resultado: negativo.



Muestra 2 (*Curtobacterium* spp), inoculación de bacteria bacilo Gram positivo, resultado: negativo.



Muestra 4 (*Curtobacterium* spp), inoculación de bacteria bacilo Gram, resultado: negativo.



Muestra 5 (*Curtobacterium* spp), inoculación de bacteria cocobacilo Gram positivo, resultado: negativo.

Continuación Figura 23



Muestra A (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), inoculación de bacteria bacilo Gram positivo, resultado: positivo.



Muestra B (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), inoculación de bacteria bacilo Gram positivo, resultado: positivo y Muestra E (*Microbacterium* spp), bacteria bacilo Gram negativo, resultado: negativo.



Muestra C (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), inoculación de bacteria bacilo Gram positivo, resultado: positivo.



Muestra D (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*), inoculación de bacteria bacilo Gram positivo, resultado: positivo.

F. Ensayo de patogenicidad en plántulas de tomate variedad comercial, susceptible a *Cmm*.

Figura 24. Síntomas desarrollados en las plantas de tomate 6 días después de la inoculación con bacterias aisladas de semillas y planta de tomate.



Continuación Figura 24

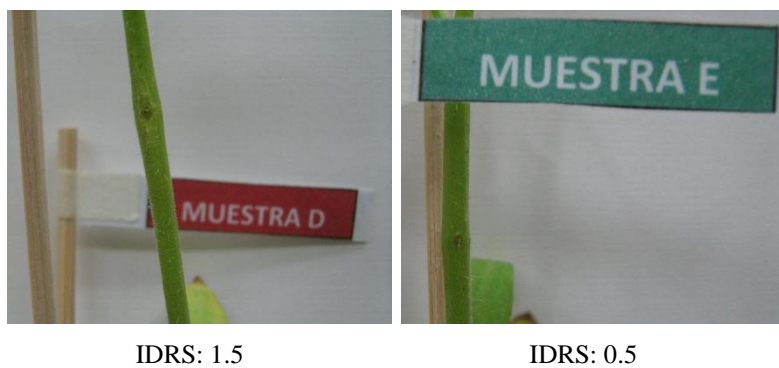


Figura 25. Síntomas desarrollados en las plantas de tomate 11 días después de la inoculación con bacterias aisladas de semillas y planta de tomate.



Continuación Figura 25

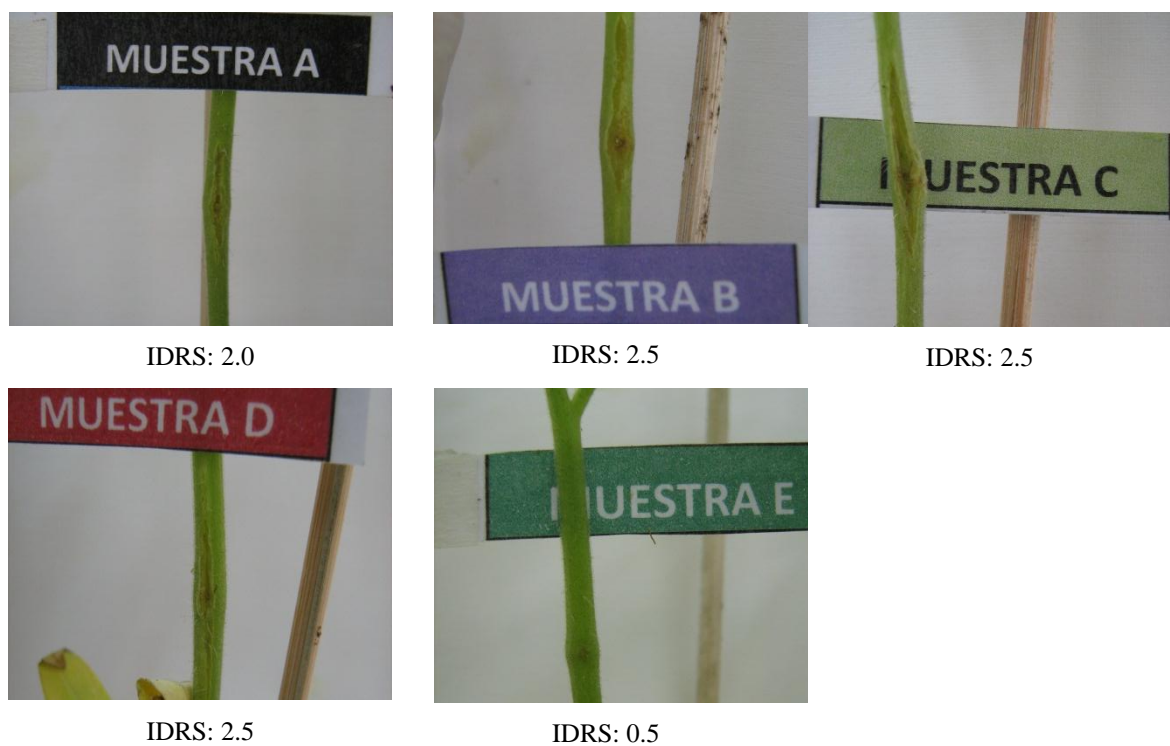


Figura 26. Síntomas desarrollados en las plantas de tomate 20 días después de la inoculación con bacterias aisladas de semillas y planta de tomate



Continuación Figura 26



IDRS: 1



IDRS: 0



IDRS: 5



IDRS: 5



IDRS: 3.5



IDRS: 3.5



IDRS: 1

G. Diagnóstico por PCR de la enfermedad del cáncer bacteriano del tomate ocasionado por *Cmm* en plántulas infectados.

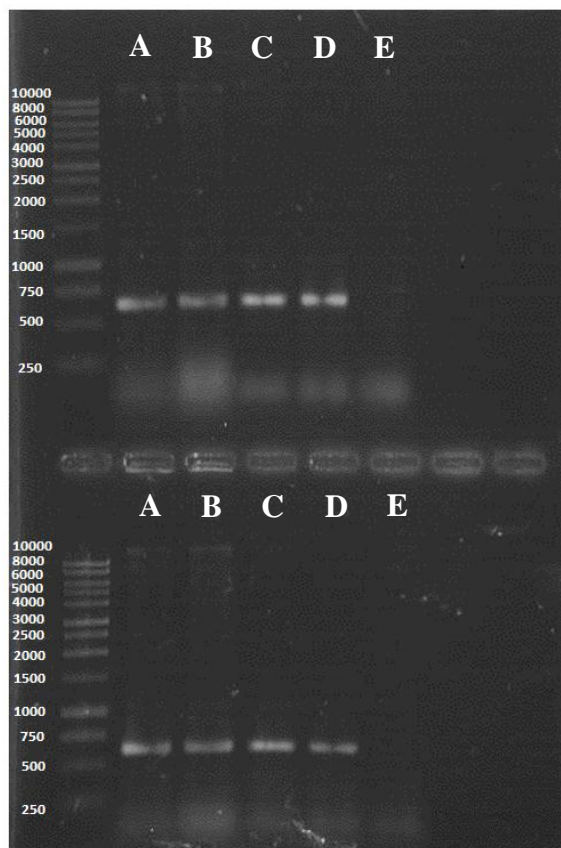
Figura 27. Migración de los productos de PCR para la detección de *Cmm*.

Gel de agarosa al 1% en TAE 1X para la detección de los plásmidos pCM1 y pCM2 con los iniciadores Cm3-Cm4 y CMM5-CMM6 respectivamente en ADN de plantas inoculadas las bacterias aisladas a partir de semilla de tomate. Orden de izquierda a derecha (arriba y abajo): escalera molecular 1kb, Muestra 1, muestra 2, muestra 3, muestra 4, control negativo.



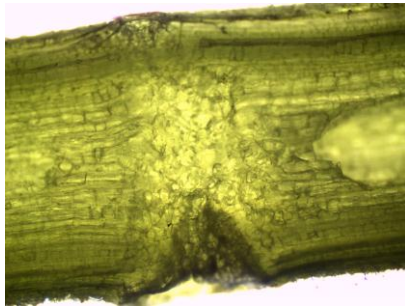
Figura 28. Migración de los productos de PCR para la detección de *Cmm*.

Gel de agarosa al 1% en TAE 1X para la detección de los plásmidos pCM1 y pCM2 con los iniciadores Cm3-Cm4 y CMM5-CMM6 respectivamente en ADN de plantas inoculadas las bacterias aisladas a partir de planta de tomate. Orden de izquierda a derecha (arriba y abajo): escalera molecular 1kb, Muestra A, muestra B, muestra C, muestra D, muestra E. El tamaño esperado de los productos de los iniciadores *Cmm3-Cmm4* es 635 bp, y 614 bp para el caso de *CMM5-CMM6*.

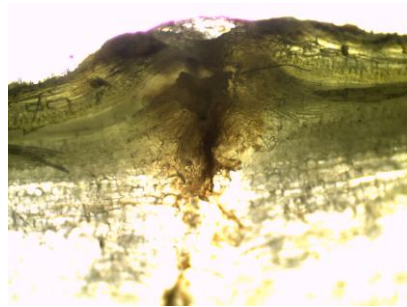


H. Daño tisular ocasionado por bacterias inoculadas en los plántulas de tomate.

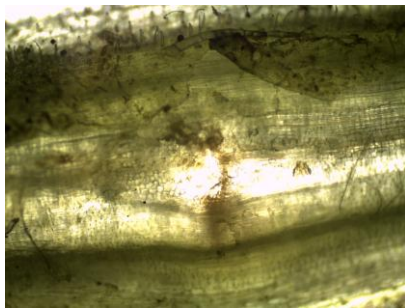
Figura 29. Corte longitudinal del tallo de las plántulas inoculados con bacterias evaluadas, aumento 400X.



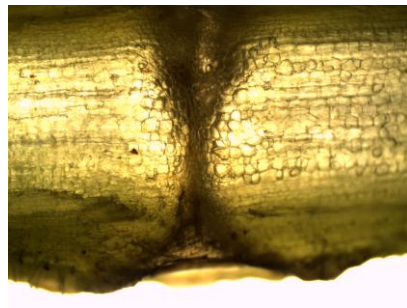
Planta control (-)



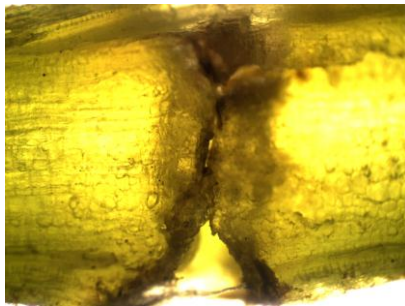
Planta inoculada con *Micrococcus* spp que corresponde a la muestra 1



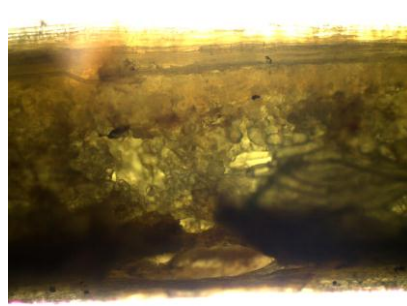
Planta inoculada con *Curtobacterium* spp que corresponde a la muestra 2



Planta inoculada con *Curtobacterium* spp que corresponde a la muestra 4

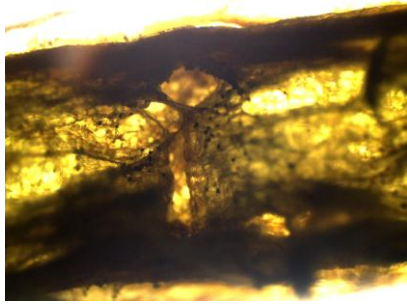


Planta inoculada con *Curtobacterium* spp que corresponde a la muestra 5

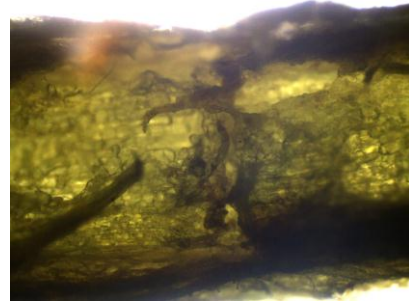


Planta inoculada con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* que corresponde a la muestra A

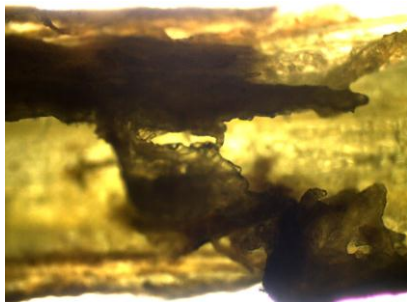
Continuación Figura 29



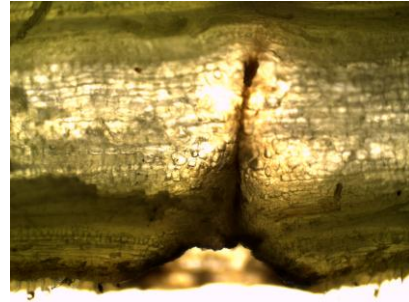
Planta inoculada con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* que corresponde a la muestra B



Planta inoculada con muestra *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* que corresponde a la C



Planta inoculada con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* que corresponde a la muestra D



Planta inoculada con *Microbacterium* spp que corresponde a la muestra E

I. Secuencias consenso de la región 16S ADNr.

Secuencia consenso de la región 16S ADNr de *Micrococcus* spp que corresponde a la muestra 1.

```
TGACGACAACCATGCACCACCTGTGAACCCGCCCCAAAGGGGRAACCGTATCTCTACGGCGATCGAGAA
CATGTCAAGCCTTGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGC
CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTA CTTCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTG
CGGCGCGGAAACCGTGGAATGGTCCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATC
TAATCCTGTTTCGCTCCCCATGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGCCCAGAGACCTGCCTTCGCCATC
GGTGTTCCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCCTACACCAGGAATTCAGTCTCCCCTACTGCACTCTAG
TCTGCCCGTACCCACCGCAGATCCGGGGTTAAGCCCCGACTTTTACGACAGACGCGACAAACCGCCTAC
GAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGATAACGCTCGCACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAG
TTAGCCGGTGCTTCTTCTGTAGGTACCGTCACTTTTCGCTTCTTCCCTACTGAAAGAGTTTACAACCCGA
AGGCCGTATCCCTCACGCGCGCTCGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATATTCCCCTACTGCTGC
CTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGT
```

Alineación de la secuencia consenso de la región 16S ADNr de la muestra 1 con la búsqueda en la base de datos del GenBank.

```
>gb|JN411682.1| Micrococcus luteus strain BGCC 1079 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1249
Score = 1332 bits (721), Expect = 0.0
Identities = 727/730 (99%), Gaps = 1/730 (0%)
Strand=Plus/Minus
Query 1 TGACGACAACCATGCACCACCTGTGAACCCGCCCCAAAGGGGAAACCGTATCTCTACGG 60
Sbjct 1038 TGACGACAACCATGCACCACCTGTGAACCCG-CCCCAAAGGGGAAACCGTATCTCTACGG 980
Query 61 CGATCGAGAACATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGGCGTTGCATCGAATTAATCCGCAT 120
Sbjct 979 CGATCGAGAACATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGGCGTTGCATCGAATTAATCCGCAT 920
Query 121 GCTCCGCCGCTTGTGGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGGGGCGTACT 180
Sbjct 919 GCTCCGCCGCTTGTGGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGGGGCGTACT 860
Query 181 CCCCAGCGGGGCCTTAATGCGTTAGCTGCGGCGGGAAACCGTGAATGGTCCCCACA 240
Sbjct 859 CCCCAGCGGGGCCTTAATGCGTTAGCTGCGGCGGGAAACCGTGAATGGTCCCCACA 800
Query 241 CCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACAGGGTATCTAATCCTGTTCCGTCGCCAT 300
Sbjct 799 CCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACAGGGTATCTAATCCTGTTCCGTCGCCAT 740
Query 301 GCTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGCCAGAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTC 360
Sbjct 739 GCTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGCCAGAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCTC 680
Query 361 CTGATATCTGGGCATTCCACCGCTACACCGAATTCCAGTCTCCCTACTGCACTCTAG 420
Sbjct 679 CTGATATCTGGGCATTCCACCGCTACACCGAATTCCAGTCTCCCTACTGCACTCTAG 620
Query 421 TCTGCCCTACCCACCGCAGATCCGGGGTTAAGCCCGGACTTTCACGACAGACGCGACA 480
Sbjct 619 TCTGCCCTACCCACCGCAGATCCGGGGTTAAGCCCGGACTTTCACGACAGACGCGACA 560
Query 481 AACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCGGGATAACGCTCGCACCTACGTATTA 540
Sbjct 559 AACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCGGGATAACGCTCGCACCTACGTATTA 500
Query 541 CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCCTTCTGTAGGTACCGTCACTTTCGCTT 600
Sbjct 499 CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCCTTCTGTAGGTACCGTCACTTTCGCTT 440
Query 601 CTTCCCTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGCCGTCATCCCTCAGCGGGCTCGCTGC 660
Sbjct 439 CTTCCCTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGCCGTCATCCCTCAGCGGGCTCGCTGC 380
Query 661 ATCAGGCTTGGCCCATTTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCC 720
Sbjct 379 ATCAGGCTTGGCCCATTTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCC 320
Query 721 GTGTCTCAGT 730
Sbjct 319 GTGTCTCAGT 310
```

Secuencia consenso de la región 16S ADNr de *Curtobacterium* spp que corresponde a la muestra 2

GACAACCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGACCATCTCTGGCCGTTTCCGGTGTATGTCA
AGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCGTC
AATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGGCGCGTACTCCCAGGCGGGGCGCTTAATGCGTTAGCTACGACACA
GAAACCGTGAAAGGTCCCTACATCTAGCGCCCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCT
GTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTT
CTCCTGATATCTGGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCGAATCTCCCTACCGCACTCTAGTCTGCC
GTACCCACTGCAAGCCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCT
TTACGCCCAATAATTCGGACAACGCTTGACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCG
GTGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTACTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCG
CATCCCTCACGCGGCTTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCC
AGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAT

Alineación de la secuencia consenso de la región 16S ADNr de la muestra 2 con la búsqueda en la base de datos del GenBank.

```
>gb|JN196138.1| Curtobacterium sp. THG B325 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1270

Score = 1332 bits (721), Expect = 0,0
Identities = 721/721 (100%), Gaps = 0/721 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GACAACCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGACCATCTCTGGCCGTTTCGG 60
Sbjct 1018 GACAACCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGACCATCTCTGGCCGTTTCGG 959

Query 61 GTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGC 120
Sbjct 958 GTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGC 899

Query 121 CGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGGCGCGTACTCCCCAGG 180
Sbjct 898 CGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGGCGCGTACTCCCCAGG 839

Query 181 CGGGGCGCTTAATGCGTTAGCTACGACACAGAAACCGTGGAAAGGTCCTACATCTAGCG 240
Sbjct 838 CGGGGCGCTTAATGCGTTAGCTACGACACAGAAACCGTGGAAAGGTCCTACATCTAGCG 779

Query 241 CCCAACGTTTACGGCGTGGACTACAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCG 300
Sbjct 778 CCCAACGTTTACGGCGTGGACTACAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCG 719

Query 301 CTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATAT 360
Sbjct 718 CTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATAT 659

Query 361 CTGCGCATCCACCGGTACACCAGGAATCCCAATCTCCCTACCGCACTCTAGTCTGCC 420
Sbjct 658 CTGCGCATCCACCGGTACACCAGGAATCCCAATCTCCCTACCGCACTCTAGTCTGCC 599

Query 421 GTACCCACTGCAAGCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTCACAGCAGACGGCACAACCGCC 480
Sbjct 598 GTACCCACTGCAAGCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTCACAGCAGACGGCACAACCGCC 539

Query 481 TACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCGGGACAACGCTTGACCCCTACGTATTACCGGGC 540
Sbjct 538 TACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCGGGACAACGCTTGACCCCTACGTATTACCGGGC 479

Query 541 TGCTGGCAGTAGTTAGCCGGTGCCTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTGCTCTCTCCCT 600
Sbjct 478 TGCTGGCAGTAGTTAGCCGGTGCCTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTGCTCTCTCCCT 419

Query 601 ACTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTGCATCAGG 660
Sbjct 418 ACTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTGCATCAGG 359

Query 661 TTTCCGCCATTGTGCAATATCCCACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGCTC 720
Sbjct 358 TTTCCGCCATTGTGCAATATCCCACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGCTC 299

Query 721 A 721
Sbjct 298 A 298
```

Secuencia consenso de la región 16S ADNr de *Curtobacterium* spp que corresponde a la muestra 4.

```
GAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGCGACCATCTCTGGCCGTTTCGGT
GTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGG
CCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTTCGCGCCGTAATCCCCAGGCGGGGCGCTTAATGCGTTAGCT
ACGACACAGAAACCGTGGAAAGGTCCTACATCTAGCGCCCAACGTTTACGGCGTGGACTACAGGGTAT
CTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCAT
CGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGGTACACCAGGAATCCCAATCTCCCTACCGCACTCTA
GTCTGCCGTACCCACTGCAAGCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTCACAGCAGACGGCACAACCGCCTA
CGAGCTCTTTACGCCAATAATTCGGGACAACGCTTGACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTA
GTTAGCCGGTGCCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTTCGCTTCTTCCCTACTAAAAGAGGTTTACAACCCG
AAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTTCCGCCATTGTGCAATATCCCACTGCTC
CTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGCTCA
```

Alineación de la secuencia consenso de la región 16S ADNr de la muestra 4 con la búsqueda en la base de datos del GenBank.

```
>gb|JN196138.1| Curtobacterium sp. THG B325 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1270

Score = 1347 bits (729), Expect = 0.0
Identities = 729/729 (100%), Gaps = 0/729 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1      GAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGGACCATCTCTGGC 60
Sbjct 1026   GAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTACACCGACCACAAGGGGGGACCATCTCTGGC 967
Query 61     CGTTTCGGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCA 120
Sbjct 966     CGTTTCGGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCA 907
Query 121    TGCTCCGCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTAC 180
Sbjct 906     TGCTCCGCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTAC 847
Query 181    TCCCCAGGCGGGGGCGCTTAATGGGTTAGCTACGACACAGAAACCGTGGAAAGGTCCTAC 240
Sbjct 846     TCCCCAGGCGGGGGCGCTTAATGGGTTAGCTACGACACAGAAACCGTGGAAAGGTCCTAC 787
Query 241    ATCTAGCGCCCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGATATCTAATCCTGTTGCTCCCA 300
Sbjct 786     ATCTAGCGCCCAACGTTTACGGCGTGGACTACCAGGATATCTAATCCTGTTGCTCCCA 727
Query 301    CGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCACAGAGATCTGCCTTGGCCATCGGTGTCT 360
Sbjct 726     CGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCACAGAGATCTGCCTTGGCCATCGGTGTCT 667
Query 361    CCTGATATCTGCGCATTCACCGCTACACCAGGAATTCGAATCTCCCTACCGCACTCTA 420
Sbjct 666     CCTGATATCTGCGCATTCACCGCTACACCAGGAATTCGAATCTCCCTACCGCACTCTA 607
Query 421    GTCTGCCGCTACCCACTGCAAGCCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACGCGAC 480
Sbjct 606     GTCTGCCGCTACCCACTGCAAGCCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACGCGAC 547
Query 481    AAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCGGACAACGCTTGCACCTACGTATT 540
Sbjct 546     AAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCGGACAACGCTTGCACCTACGTATT 487
Query 541    ACCGCGGCTGTGGCAGTAGTTAGCCGGTGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACCTTTCGCT 600
Sbjct 486     ACCGCGGCTGTGGCAGTAGTTAGCCGGTGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACCTTTCGCT 427
Query 601    TCTTCCCTACTAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGCGCTTGTGT 660
Sbjct 426     TCTTCCCTACTAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGCGCTTGTGT 367
Query 661    CATCAGGCTTTCGCCATTGTGCAATATTCGCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGC 720
Sbjct 366     CATCAGGCTTTCGCCATTGTGCAATATTCGCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGC 307
Query 721    CGTGTCTCA 729
Sbjct 306     CGTGTCTCA 298
```

Secuencia consenso de la región 16S ADNr de *Curtobacterium* spp que corresponde a la muestra 5.

TCTCTGGCCGTTTCCGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATG
CTCCGCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGG
GCGCTTAATGCGTTAGCTACGACACAGAAACCGTGGAAAGGTCCCTACATCTAGCSCCAACGTTTACGG
CGTGGACTACCAGGATATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCCA
GAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCGAAT
CTCCCCTACCGCACTCTAGTCTGCCCGTACCCACTGCAAGCCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCA
GACGCGACAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCGGACAACGCTTGCACCTACGTATTAC
CGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACCTTTCGCTTCTCCCTACTA
AAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTTCGCCATTGTG
CAATATTCGCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGCTCAGTCCCA

Alineación de la secuencia consenso de la región 16S ADNr de la muestra 5 con la búsqueda en la base de datos del GenBank.

```
>gb|JN084144.1| Curtobacterium oceanosedimentum strain Y1 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=1386

Score = 1262 bits (683), Expect = 0.0
Identities = 683/683 (100%), Gaps = 0/683 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 TCTCTGGCCGTTTCOGGTGATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCOGGTTGCATCGAATT 60
Sbjct 940 TCTCTGGCCGTTTCOGGTGATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCOGGTTGCATCGAATT 881

Query 61 AATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGC 120
Sbjct 880 AATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGC 821

Query 121 GGCCGTACTCCCCAGGCGGGGGGCTTAATGCGTTAGCTACGACACAGAAAACCGTGGAAAG 180
Sbjct 820 GGCCGTACTCCCCAGGCGGGGGGCTTAATGCGTTAGCTACGACACAGAAAACCGTGGAAAG 761

Query 181 GTCCCTACATCTAGCGCCCAACGTTTACGGGTGGACTACCAGGATCTAATCCTGTTTC 240
Sbjct 760 GTCCCTACATCTAGCGCCCAACGTTTACGGGTGGACTACCAGGATCTAATCCTGTTTC 701

Query 241 GCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCACAGATCTGCTTCGCCATCG 300
Sbjct 700 GCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCACAGATCTGCTTCGCCATCG 641

Query 301 GTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATCCAATCTCCCTTACC 360
Sbjct 640 GTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATCCAATCTCCCTTACC 581

Query 361 GCACCTAGTCTGCCCGTACCCACTGCAAGCCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCA 420
Sbjct 580 GCACCTAGTCTGCCCGTACCCACTGCAAGCCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCA 521

Query 421 GACGCGACAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCGGACAACGTTGCACCC 480
Sbjct 520 GACGCGACAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCGGACAACGTTGCACCC 461

Query 481 TACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCA 540
Sbjct 460 TACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCA 401

Query 541 CTTTCGCTTCTTCCCTACTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCGGTATCCCTCACGCGG 600
Sbjct 400 CTTTCGCTTCTTCCCTACTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCGGTATCCCTCACGCGG 341

Query 601 CGTTGCTGCATCAGGCTTTCGCCCCATTGTGCAATATTCGCCACTGCTGCCCTCCCGTAGGA 660
Sbjct 340 CGTTGCTGCATCAGGCTTTCGCCCCATTGTGCAATATTCGCCACTGCTGCCCTCCCGTAGGA 281

Query 661 GTCTGGGCCGCTGTCTCAGTCCCA 683
Sbjct 280 GTCTGGGCCGCTGTCTCAGTCCCA 258
```

Secuencia consenso de la región 16S ADNr de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* que corresponde al control positivo de ADN de la cepa A300.

```
ACATTTCTGCATGTTTCCGGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGC
ATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGGCGCCGTAATCCCCAGGC
GGGAACCTAATGCGTTAGCTGCGACACGGAGACCGTGGAAATGGTCCCCACATCTAGTTCCCAACGTTTA
CGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCATGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGC
CCAGAGATCTGCCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTC
AATCTCCCCTACCGACTCTAGTCTGCCCGTACCCACTGCAGACCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACA
GCAGACGCGACAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCGGACAACGTTGCACCCTACGTAT
TACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTTCGCTTCTTCCCTA
CTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCGGTATCCCTCACGCGGCTTGTGCTGCATCAGGCTTTCGCCATT
GTGCAATATTCGCCACTGCTGCCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGCTGTCTCAGTCCC
```

Alineación de la secuencia consenso de la región 16S ADNr del control positivo de ADN de la cepa A300 con la búsqueda en la base de datos del GenBank.

```
>gb|JN603277.1| Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain LMG 7333
16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1359

Score = 1266 bits (685), Expect = 0.0
Identities = 685/685 (100%), Gaps = 0/685 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 ACATTTCTGCATGTTTCCGGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTCATCGA 60
Sbjct 991 ACATTTCTGCATGTTTCCGGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTCATCGA 932
Query 61 ATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTTAGCCT 120
Sbjct 931 ATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTTAGCCT 872
Query 121 TCGGGCCGTA CTCCCGAGCGGGGA ACTTAATGCGT TAGCTGCGACACGGAGACCGTGA 180
Sbjct 871 TCGGGCCGTA CTCCCGAGCGGGGA ACTTAATGCGT TAGCTGCGACACGGAGACCGTGA 812
Query 181 ATGGTCCCCACATCTAGTTC CCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTG 240
Sbjct 811 ATGGTCCCCACATCTAGTTC CCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTG 752
Query 241 TTCGTC CCCCATGCTTTGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCA 300
Sbjct 751 TTCGTC CCCCATGCTTTGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCA 692
Query 301 TCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTC AATCTCCCT 360
Sbjct 691 TCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTC AATCTCCCT 632
Query 361 ACCGCAC TCTAGTCTGCCCGTACCCACTGCAGACCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTT CACA 420
Sbjct 631 ACCGCAC TCTAGTCTGCCCGTACCCACTGCAGACCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTT CACA 572
Query 421 GCAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATRAATCCGGACAACGCTT GCA 480
Sbjct 571 GCAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATRAATCCGGACAACGCTT GCA 512
Query 481 CCCTACGTATTACCGCGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGTCTTTTCTGCAGGTACCG 540
Sbjct 511 CCCTACGTATTACCGCGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGTCTTTTCTGCAGGTACCG 452
Query 541 TCAC TTTGCTCTTCCCTACTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCAGC 600
Sbjct 451 TCAC TTTGCTCTTCCCTACTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCAGC 392
Query 601 CGGCGTGTGTCATCAGGCTTTCCGCCATTGTGCAATATTC CCCCAGTGTGCTCCCGTGA 660
Sbjct 391 CGGCGTGTGTCATCAGGCTTTCCGCCATTGTGCAATATTC CCCCAGTGTGCTCCCGTGA 332
Query 661 GGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCC 685
Sbjct 331 GGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCC 307
```

Secuencia consenso de la región 16S ADNr de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* que corresponde a la muestra A.

```
ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATACCGACCTTGC GGGGCACACATTTCTGCATGTTTCC
GGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGC
GGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGC GGGCCGTA CTCCCGAGCGGGGA ACTTAATGCGTTA
GCTGCGACACGGAGACCGTGAATGGTCCCCACATCTAGTTC CCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGG
TATCTAATCCTGTTGCTCCCATGCTTTGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGC
CATCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTC AATCTCCCTACCGCACT
CTAGTCTGCCCGTACCCACTGCAGACCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTT CACAGCAGACGCGACAAACCGC
CTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCACCCTACGTATTACCGCGCTGCTGGCAC
GTAGTTAGCCGGTGTCTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTGCTTCTTCCCTACTAAAAGAGGTTTACAAC
CCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCTTGTGTCATCAGGCTTTG CCCCATTGTGCAATATTC CCCCAGT
CTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCC
```

Alineación de la secuencia consenso de la región 16S ADNr de la muestra A con la búsqueda en la base de datos del GenBank.

```

>gb|HQ144242.1| Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain Cmm VT3
16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1391

Score = 1358 bits (735), Expect = 0.0
Identities = 735/735 (100%), Gaps = 0/735 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATACCGACCTTGCGGGGCACACATTTCT 60
Sbjct 995 ACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATACCGACCTTGCGGGGCACACATTTCT 936

Query 61 GCATGTTTCGGGTATATGTCAAGCCTTGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCC 120
Sbjct 935 GCATGTTTCGGGTATATGTCAAGCCTTGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCC 876

Query 121 GCATGCTCCGCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCG 180
Sbjct 875 GCATGCTCCGCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCG 816

Query 181 TACTCCCCAGGCGGGGAACCTAATGCGTTAGCTGCGACACGGAGACCGTGGAAATGGTCCC 240
Sbjct 815 TACTCCCCAGGCGGGGAACCTAATGCGTTAGCTGCGACACGGAGACCGTGGAAATGGTCCC 756

Query 241 CACATCTAGTTCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGTTATCTAATCCTGTTCCGCTCC 300
Sbjct 755 CACATCTAGTTCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGTTATCTAATCCTGTTCCGCTCC 696

Query 301 CCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTT 360
Sbjct 695 CCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTT 636

Query 361 CCTCCTGATATCTGCGCATTCACCGCTACACCAGGAATCCAAATCTCCCTACCGCACT 420
Sbjct 635 CCTCCTGATATCTGCGCATTCACCGCTACACCAGGAATCCAAATCTCCCTACCGCACT 576

Query 421 CTAGTCTGCCGTACCCACTGCAGACCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACGCG 480
Sbjct 575 CTAGTCTGCCGTACCCACTGCAGACCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACGCG 516

Query 481 GACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCGGACACGCTTGACCCCTACGT 540
Sbjct 515 GACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCGGACACGCTTGACCCCTACGT 456

Query 541 ATTACCGCGGCTGCTGGCAGTGTAGCCGGTGTCTTTTCTGCGAGGTACCGTCACTTTT 600
Sbjct 455 ATTACCGCGGCTGCTGGCAGTGTAGCCGGTGTCTTTTCTGCGAGGTACCGTCACTTTT 396

Query 601 GCTTCTCCCTACTAAAAGAGGTTTACAACCCGAGGCGGTCATCCCTCACGCGGCGTTG 660
Sbjct 395 GCTTCTCCCTACTAAAAGAGGTTTACAACCCGAGGCGGTCATCCCTCACGCGGCGTTG 336

Query 661 CTGCATCAGGCTTTCGCCCATTTGTGCAATATCCCCACTGTGCTCCCGTAGGAGTCTG 720
Sbjct 335 CTGCATCAGGCTTTCGCCCATTTGTGCAATATCCCCACTGTGCTCCCGTAGGAGTCTG 276

Query 721 GGCCGTGTCTCAGTC 735
Sbjct 275 GGCCGTGTCTCAGTC 261

```

Secuencia consenso de la región 16S ADNr de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* que corresponde a la muestra B.

```

GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATACCGACCTTGCGGGGCACACATTTCTGCATGTTTC
CGGTATATGTCAAGCCTTGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCGCTTGTG
CGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTAATCCAGGCGGGGAACCTAATGCGTT
AGCTGCGACACGGAGACCGTGGAAATGGTCCCCACATCTAGTTCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGG
GTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCG
CCATCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTCACCGCTACACCAGGAATCCAAATCTCCCTACCGCAC
TCTAGTCTGCCGTACCCACTGCAGACCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACGCGACAAACCG
CCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCGGACACGCTTGACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
CGTAGTTAGCCGGTGTCTTTTCTGCGAGGTACCGTCACTTTTCGCTTCTCCCTACTAAAAGAGGTTTACA
CCCGAAGGCGGTCATCCCTCACGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTTTCGCCCATTTGTGCAATATCCCCACT
GCTGCCTCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCA

```

Alineación de la secuencia consenso de la región 16S ADNr de la muestra B con la búsqueda en la base de datos del GenBank.

```
>gb|HQ144242.1| Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain Cmm VT3
16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1391

Score = 1365 bits (739), Expect = 0.0
Identities = 739/739 (100%), Gaps = 0/739 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1 GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATACCGACCTTGCGGGGCACACATTTTC 60
Sbjct 996 GACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATACCGACCTTGCGGGGCACACATTTTC 937

Query 61 TGCAATGTTCCGGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATC 120
Sbjct 936 TGCAATGTTCCGGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATC 877

Query 121 CGCATGCTCCGCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTATAGCCTTGCAGGCC 180
Sbjct 876 CGCATGCTCCGCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTATAGCCTTGCAGGCC 817

Query 181 GTACTCCCCAGGCGGGGAACCTTAATGCGTTAGCTGCGACACGGAGACCGTGAATGGTCC 240
Sbjct 816 GTACTCCCCAGGCGGGGAACCTTAATGCGTTAGCTGCGACACGGAGACCGTGAATGGTCC 757

Query 241 CCACATCTAGTTCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCGGGTATCTAATCCTGTTGCGTCC 300
Sbjct 756 CCACATCTAGTTCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCGGGTATCTAATCCTGTTGCGTCC 697

Query 301 CCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGT 360
Sbjct 696 CCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGT 637

Query 361 TCCTCCTGATATCTGCGCATTCACCGCTACACCAGGAATTCGAATCTCCCTACCGCAC 420
Sbjct 636 TCCTCCTGATATCTGCGCATTCACCGCTACACCAGGAATTCGAATCTCCCTACCGCAC 577

Query 421 TCTAGTCTGCCCGTACCCACTGCAGACCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTCCACAGCAGACG 480
Sbjct 576 TCTAGTCTGCCCGTACCCACTGCAGACCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTCCACAGCAGACG 517

Query 481 CGACAAACCGCTACGAGCTCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGACCCCTACG 540
Sbjct 516 CGACAAACCGCTACGAGCTCTTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGACCCCTACG 457

Query 541 TATTACCGGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTCTTTTTCTGAGGTAACCGTCACTTT 600
Sbjct 456 TATTACCGGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTCTTTTTCTGAGGTAACCGTCACTTT 397

Query 601 CGCTCTTCCCTACTAAAGAGGTTTACAACCCGAGGCGGTATCCCTCAGCGGGGTT 660
Sbjct 396 CGCTCTTCCCTACTAAAGAGGTTTACAACCCGAGGCGGTATCCCTCAGCGGGGTT 337

Query 661 GCTGCATCAGGCTTTGCGCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT 720
Sbjct 336 GCTGCATCAGGCTTTGCGCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCT 277

Query 721 GGGCCGCTGCTCAGTCCCA 739
Sbjct 276 GGGCCGCTGCTCAGTCCCA 258
```

Secuencia consenso de la región 16S ADNr de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* que corresponde a la muestra C.

```
CGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATACCGACCTTGCGGGGCACACATTTCTGCAWGTTCGGT
ATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGATGCTCCGCGCTTGTGCGGG
CCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCAGCCGACTCCCCAGGCGGGGAACCTTAATGCGTTAGCT
GCGACACGGAGACCGTGAATGGTCCCCACATCTAGTTCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCGGGTAT
CTAATCCTGTTTCGCTCCCCATGCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCAT
CGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCGAATCTCCCTACCGCACTCTA
GTCTGCCCGTACCCACTGCAGACCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACGCGACAACCGCCTA
CGAGCTCTTACGCCAATAAATCCGGACAACGCTTGACCCCTACGTTACCGGGCTGCTGGCACGTA
GTTAGCCGGTCTTTTTCTGAGGTAACCGTCACTTTTCGCTTCTTCCCTACTAAAGAGGTTTACAACCCG
AAGGCGTATCCCTCAGCGGGGTTGCTGCATCAGGCTTTGCGCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTG
CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCGGTGCTCAGTCCC
```

Alineación de la secuencia consenso de la región 16S ADNr de la muestra C con la búsqueda en la base de datos del GenBank.

```
>gb|HQ144240.1| Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain Cmm VT14
16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1387

Score = 1352 bits (732), Expect = 0.0
Identities = 733/734 (99%), Gaps = 0/734 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1   CGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATACCGACCTTGC GG GGCACACATTTCTGCA 60
Sbjct 994  CGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATACCGACCTTGC GG GGCACACATTTCTGCA 935

Query 61  WGTTCGCGGTATATGTCRAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCA 120
Sbjct 934  TGTTCGCGGTATATGTCRAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCA 875

Query 121 TGCTCCGCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGC GG CCGTAC 180
Sbjct 874  TGCTCCGCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGC GG CCGTAC 815

Query 181 TCCCCAGGCGGGGAACCTTAATGCGTTAGCTGCGACACGGAGACCGTGG AATGGTCCCCAC 240
Sbjct 814  TCCCCAGGCGGGGAACCTTAATGCGTTAGCTGCGACACGGAGACCGTGG AATGGTCCCCAC 755

Query 241 ATCTAGTTC CCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCA 300
Sbjct 754  ATCTAGTTC CCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCA 695

Query 301 TGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCT 360
Sbjct 694  TGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCCCT 635

Query 361 CCTGATATCTGCGCATTCACCGCTACACCGAATTC AATCTCCCTACCGCACTCTA 420
Sbjct 634  CCTGATATCTGCGCATTCACCGCTACACCGAATTC AATCTCCCTACCGCACTCTA 575

Query 421 GTCTGCCCGTACCCACTGCAGACCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACCGCAC 480
Sbjct 574  GTCTGCCCGTACCCACTGCAGACCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACCGCAC 515

Query 481 AAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCGGACAACGCTTGCAACCTACGTATT 540
Sbjct 514  AAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAATTCGGACAACGCTTGCAACCTACGTATT 455

Query 541 ACCCGGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCT 600
Sbjct 454  ACCCGGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCT 395

Query 601 TCTTCCCTACTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGCCGTCATCCCTCAGCGCGGTTGCTG 660
Sbjct 394  TCTTCCCTACTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGCCGTCATCCCTCAGCGCGGTTGCTG 335

Query 661 CATCAGGCTTTCGCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGC 720
Sbjct 334  CATCAGGCTTTCGCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGC 275

Query 721 CGTGTCTCAGTCCC 734
Sbjct 274  CGTGTCTCAGTCCC 261
```

Secuencia consenso de la región 16S ADNr de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* que corresponde a la muestra D.

```
CACCTGTATACCGACCTTGC GG GGCACACATTTCTGCATGTTTCGGTATATGTC AAGCCTTGGTAAGGT
TCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTT
TTAGCCTTGC GG CCGTACTCCCCAGGCGGGGAACCTTAATGCGTTAGCTGCGACACGGAGACCGTGG AATG
GTCCCCACATCTAGTTCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCATG
CTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATATCTGC
GCATTCCACCGCTACACCAGGAATTC AATCTCCCTACCGCACTCTAGTCTGCCCGTACCCACTGCAGA
CCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACCGGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATAAT
TCCGGACAACGCTTGCACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTTTTCTGCA
GGTACCGTCACTTTGCTTCTTCCCTACTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGCCGTCATCCCTCAGCGG
CGTTGCTGCATCAGGCTTTCGCCATTGTGCAATATCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCG
TGCTCA
```

Alineación de la secuencia consenso de la región 16S ADNr de la muestra D con la búsqueda en la base de datos del GenBank.

```
>gb|HQ144238.1| Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis strain Cmm VT12
16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1393

Score = 1306 bits (707), Expect = 0.0
Identities = 707/707 (100%), Gaps = 0/707 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1   CACCTGTATACCGACCTTGCGGGGCACACATTTCTGCATGTTCCGGTATATGTCAAGCC 60
Sbjct 973  CACCTGTATACCGACCTTGCGGGGCACACATTTCTGCATGTTCCGGTATATGTCAAGCC 914

Query 61  TTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCC 120
Sbjct 913  TTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCC 854

Query 121  CCCGTCAAATCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGGGAACCTAATG 180
Sbjct 853  CCCGTCAAATCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGGGAACCTAATG 794

Query 181  CGTTAGCTGCGACACGGAGACCGTGAATGGTCCCCACATCTAGTTCCCAACGTTTACGG 240
Sbjct 793  CGTTAGCTGCGACACGGAGACCGTGAATGGTCCCCACATCTAGTTCCCAACGTTTACGG 734

Query 241  CATGGACTACCAGGTAATCTAATCCTGTTTCGCTCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAG 300
Sbjct 733  CATGGACTACCAGGTAATCTAATCCTGTTTCGCTCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAG 674

Query 301  TTACGGCCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTCCACC 360
Sbjct 673  TTACGGCCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTCCACC 614

Query 361  GCTACACCAGGAATTCCAATCTCCCTACCGCACTCTAGTGTGCCCGTACCCACTGCAGA 420
Sbjct 613  GCTACACCAGGAATTCCAATCTCCCTACCGCACTCTAGTGTGCCCGTACCCACTGCAGA 554

Query 421  CCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTAC 480
Sbjct 553  CCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTAC 494

Query 481  GCCCAATAATTCGGACAACGCTTGACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT 540
Sbjct 493  GCCCAATAATTCGGACAACGCTTGACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT 434

Query 541  TAGCCGGTGTCTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTTCGCTTCTTCCCTACTAAAAGAGGTTT 600
Sbjct 433  TAGCCGGTGTCTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTTCGCTTCTTCCCTACTAAAAGAGGTTT 374

Query 601  ACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGCGTTGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTTG 660
Sbjct 373  ACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGCGTTGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTTG 314

Query 661  CAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCA 707
Sbjct 313  CAATATTTCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCA 267
```

Secuencia consenso de la región 16S ADNr de *Microbacterium olearans* que corresponde a la muestra E.

```
CTGACGACAACCATGCACCACCTGTTTACGAGTGTCCAAAGAGTTGACCATTTCTGGCCCGTTCTCGTAT
ATGTCAAGCCTTGGAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGTC
CCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTAATCCCCAGGCGGGGAACCTAATGCGTTAGCTGC
GTCACGGAATCCGTGGAATGGACCCACAACCTAGTTCCCAACGTTTACGGGTGGACTACCAGGATCTCT
AAGCCTGTTTGTCTCCCAACCTTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCG
GTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCCAATCTCCCTACCGCACTCTAGT
CTGCCCGTACCCACTGCAGACCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACGCGACAAACCGCCTACG
AGCTCTTTACGCCAATAATTCGGATAACGCTTTCGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT
TAGCCGGCGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTTCGCTTCTTCCCTGCTAAAAGAGGTTTACAACCCGAA
GGCCGTCATCCCTCACGCGCGTTGCTGCATCAGGCTTTCCGCCATTGTGCAATATTTCCCACTGCTGCC
TCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTC
```

Alineación de la secuencia consenso de la región 16S ADNr de la muestra E con la búsqueda en la base de datos del GenBank.

```
>gb|JF505936.1| Microbacterium oleivorans strain KNUC9002 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=1289

Score = 1349 bits (730), Expect = 0.0
Identities = 730/730 (100%), Gaps = 0/730 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1      CTGACGACAACCATGCACCACCTGTTTACGAGTGTCCAAGAGTTGACCATTTCTGGCCC 60
Sbjct 1041    CTGACGACAACCATGCACCACCTGTTTACGAGTGTCCAAGAGTTGACCATTTCTGGCCC 982

Query 61     GTTCTCGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTCGATCGAATTAATCCGCATG 120
Sbjct 981     GTTCTCGTATATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTCGATCGAATTAATCCGCATG 922

Query 121    CTCGCGCGCTTGTGCGGGTCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGC GGCCGCTACTC 180
Sbjct 921     CTCGCGCGCTTGTGCGGGTCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGC GGCCGCTACTC 862

Query 181    CCCAGGCGGGAACTTAATGCGTTAGCTGCGTCACGGAATCCGTGGAATGGACCCACAA 240
Sbjct 861     CCCAGGCGGGAACTTAATGCGTTAGCTGCGTCACGGAATCCGTGGAATGGACCCACAA 802

Query 241    CTAGTTCCCAACGTTTACGGGGTGGACTACCAGGATCTAAGCCTGTTTGCTCCCCACC 300
Sbjct 801     CTAGTTCCCAACGTTTACGGGGTGGACTACCAGGATCTAAGCCTGTTTGCTCCCCACC 742

Query 301    CTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCTCC 360
Sbjct 741     CTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTAACGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTCTCC 682

Query 361    TGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATCCAATCTCCCTACCGCACTCTAGT 420
Sbjct 681     TGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATCCAATCTCCCTACCGCACTCTAGT 622

Query 421    CTGCCCGTACCCACTGCAGACCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACCGCACAA 480
Sbjct 621     CTGCCCGTACCCACTGCAGACCCGAGGTTGAGCCTCGGGATTTACAGCAGACCGCACAA 562

Query 481    ACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCGGGATAACGCTTGGCCCTACGTATTAC 540
Sbjct 561     ACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCGGGATAACGCTTGGCCCTACGTATTAC 502

Query 541    CGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGGCGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTC 600
Sbjct 501     CGCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGGCGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTC 442

Query 601    TTCCCTGCTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCGTCATCCCTCAAGCGGGGTTGCTGCA 660
Sbjct 441     TTCCCTGCTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCGTCATCCCTCAAGCGGGGTTGCTGCA 382

Query 661    TCAGGCTTTCGCCCATTTGTGCAATATTCGCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCG 720
Sbjct 381     TCAGGCTTTCGCCCATTTGTGCAATATTCGCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCG 322

Query 721    TGTCTCAGTC 730
Sbjct 321    TGTCTCAGTC 312
```