

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Aislamiento de bacterias Gram-positiva a partir de tejido vegetal de tomate (*Solanum lycopersicum*) y su identificación mediante técnicas microbiológicas clásicas y técnicas moleculares.

Trabajo de graduación presentado por Pablo Silva Rodríguez para optar al grado académico de Licenciado en Biología

Guatemala
2013

Aislamiento de bacterias Gram-positivas a partir de tejido vegetal de tomate (*Solanum lycopersicum*) y su identificación mediante técnicas microbiológicas clásicas y técnicas moleculares.

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

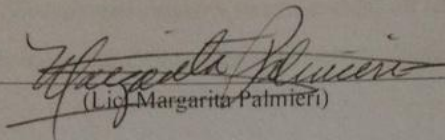


Aislamiento de bacterias Gram-positiva a partir de tejido vegetal de tomate (*Solanum lycopersicum*) y su identificación mediante técnicas microbiológicas clásicas y técnicas moleculares.


Trabajo de Graduación presentado
por Pablo Silva Rodríguez
para optar al grado de Licenciado en Biología


Guatemala
2013

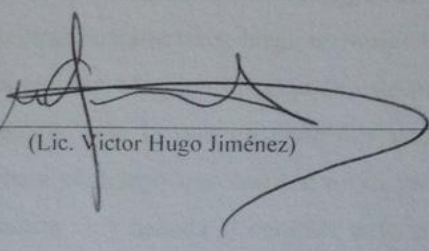
Vo. Bo. :

(f) 
(Lic. Margarita Palmieri)

Tribunal Examinador:

(f) 
(Lic. Margarita Palmieri)

(f) 
(Lic. Elena Dardón)

(f) 
(Lic. Victor Hugo Jiménez)

Fecha de aprobación: Guatemala, 13 de Junio del 2013.

PREFACIO

*<<Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas.
Ahora sabemos que está en nuestros genes>> James Watson*

Desde que era niño, con fuerte influencia de mi padre, siempre sentí gran fascinación y respeto por la ciencia. Desde las historias sobre el universo que mi padre me contaba hasta el apoyo y calidez de mi madre para inducirme al estudio de la ciencia, siempre he tenido claro que la ciencia que me apasiona es la Biología. De niño, siempre quise estudiar algo relacionado a los seres vivos, por lo que la Biología siempre fue mi primera y única opción. Cuando empecé mis estudios en la Universidad, nunca supe qué era lo que más me gustaba, menos a qué me dedicaría en mi vida profesional, sólo tenía claro que costara lo que costara, sería Biólogo. Ahora, a punto de finalizar dicho viaje, ya tengo claro qué es a lo que me dedicaré. Durante la carrera he ido aprendiendo diferentes temas, desde Fisiología, Botánica, Cordados, Invertebrados, hasta Genética, Bioquímica, Biología Celular y Molecular. Fue durante el transcurso de estos años que me di cuenta, que de esos temas, los que mejor se adecuaban a mis dudas y los que más explicaban los fenómenos era la Bioquímica, Genética y Biología Celular y Molecular. Es por ello, que una vez terminadas estas clases, supe que quería hacer mi trabajo de graduación, mi tesis, en un tema relacionado a dichas materias. Trabajar con plantas, al final, nunca fue de mis primeras opciones, sin embargo, trabajar biología molecular y genética con plantas, es una historia totalmente diferente. Mientras buscaba tesis, luego de varios tropezones con temas anteriores, decidí que estudiar el tema que hoy en día expone este trabajo de graduación, era de lo más interesante. Contenía todo lo que un científico puede desear: bacterias difíciles de trabajar (claro que para el tiempo que empecé no lo sabía, sólo tuve breves advertencias), una planta que resulta muy dañada al contraer enfermedades causadas por estas bacterias, y métodos difíciles de llevar a cabo para el estudio de dicha enfermedad. Estaba seguro de que sería, y luego de mi experiencia puedo decir que sigue siendo, todo un reto. Fue la curiosidad y el deseo de realizar un trabajo útil para mi país lo que me motivó a escoger este tema de tesis, sin saber a qué me estaba metiendo.

Dejando por un lado el cómo escogí dicho tema, quisiera agradecer a todas aquellas personas (que directa o indirectamente) contribuyeron, no sólo a que este trabajo fuera posible, sino a mi formación como persona, estudiante y profesional. Si bien sé que la lista es larga, y la memoria no es tan confiable como alguna vez supuse, procedo ahora con los agradecimientos, excusándome de antemano con cualquier persona que haya, involuntariamente claro, omitido.

Primero, quisiera agradecer a la Licda. Margarita Palmieri, directora del departamento de Biología, que tuvo que estarme aguantando y ayudando durante todos mis años en la carrera; también le agradezco el hecho de haberme despertado el interés por todos los temas anteriormente mencionados, ya que durante sus cátedras, siempre pude llenarme de respuestas, emoción y deseo por saber más e investigar. Además agradezco también el hecho de haberme dado la oportunidad, no sólo de haberme dado tema de tesis, sino por el hecho de permitirme trabajar bajo su supervisión, en su laboratorio y con su personal. Agradezco a los Licenciados Elena Dardón y Andrés Ávalos, quienes con su paciencia, conocimiento y tiempo, hicieron posible este trabajo de graduación, además de haber sido excelentes catedráticos y haber despertado la curiosidad en mí por esos temas. A la Dra. Mónica Stein, el Dr. Rubén Velázquez y la Dra. Maria Eugenia Morales, por haberme inspirado a estudiar en el extranjero, y por ser excelentes catedráticos; sin duda las clases, trabajo y laboratorios de las personas mencionadas en estos agradecimientos son de las que más he disfrutado. No podría dejar por un lado la fuerte y definitiva influencia que el Dr. Jack Schuster y el Msc. Enio Cano, han tenido en mi forma de pensar y analizar, como lo divertidas y entretenidas que fueron sus clases, sin dejar de ser en demasía, llenas de información y de aprendizaje. También quisiera agradecer a todos los técnicos del laboratorio que me apoyaron durante este tiempo y siempre fueron de mucha ayuda y respaldo, principalmente a Ofelia Paniagua, Leyda Hernández y los técnicos del laboratorio de protección vegetal.

Finalmente quisiera agradecer a mis compañeros, y, no habiendo palabras para describir la gratitud, a mis padres y familia, quienes siempre fueron de apoyo moral, emocional y económico. Los quiero a todos.

ÍNDICE

PREFACIO	IV-V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE CUADROS	IX
RESUMEN	X
I. INTRODUCCIÓN	1
A. ANTECEDENTES	1
1. Sección I: SOBRE BACTERIAS.....	1
2. SECCIÓN II: SOBRE BACTERIAS GRAM-POSITIVO	4
3. SECCIÓN III: ARNr 16S EN LA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	8
4. SECCIÓN IV: BACTERIAS <i>Clavibacter michiganensis</i>	12
5. SECCIÓN V: <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	23
6. SECCIÓN VI: MARCHITEZ BACTERIANA DEL TOMATE.....	32
B. JUSTIFICACIÓN	39
C. OBJETIVOS	40
D. HIPÓTESIS	41
II. METODOLOGÍA	42
III. RESULTADOS	54
IV. DISCUSIÓN.....	62
V. CONCLUSIONES	76
VI. RECOMENDACIONES	78
VII. LITERATURA CITADA	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Morfología bacteriana.....	2
Figura 2. Tinción Gram.....	3
Figura 3. Estructura de la pared celular de un organismo Gram-.....	4
Figura 4. Diagrama de la historia evolutiva de las bacterias Gram-positivo.....	6
Figura 5. Mapa de distribución de <i>Clavibacter michiganensis</i>	18
Figura 6. El ciclo de vida de <i>Cmm</i>	25
Figura 7. Síntomas de marchitez bacteriana en plantas de tomate.....	34
Figura 8. Marchitez bacteriana del tomate en frutos.....	34
Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología a seguir durante este trabajo.....	44
Figura 10. Rotulado de portaobjetos para tinción Gram.....	46
Figura 11. Bacterias Gram-positivo analizadas.....	54
Figura 12. Cocos y bacilos en la muestra analizada.....	55
Figura 13. Identificación molecular de las bacterias analizadas.....	56
Figura 14. Árbol de agrupamiento de muestras y secuencias de referencia.....	60
Figura 15. Electroforesis Cm3/Cm4 y Cm5/6 del 14 de julio del 2011.....	61
Figura 16. Electroforesis Cm3/Cm4 del 09 de noviembre del 2010.....	111
Figura 17. Electroforesis Cm5/Cm6 del 18 de noviembre del 2010.....	111
Figura 18. Electroforesis Cm3/Cm4 del 02 de diciembre del 2010.....	112
Figura 19. Electroforesis Cm3/Cm4 del 25 de abril del 2011.....	112
Figura 20- Electroforesis 27F/1492R del 23 de junio del 2011.....	113
Figura 21- . Electroforesis 27F/1492R del 28 de junio del 2011.....	113
Figura 22. Electroforesis Cm3/Cm4 del 08 de julio del 2011.....	114
Figura 23. Electroforesis Cm5/Cm6 del 08 de julio del 2011.....	114
Figura 24. Electroforesis 27F/1492R del 14 de julio del 2011.....	115
Figura 25. Electroforesis del producto de PCR ya purificado de ARNr16S.....	115
Figura 26. Electroforesis del producto de PCR ya purificado de ARNr16S.....	116
Figura 27. Electroforesis Cm3/Cm4 del 03 de agosto del 2011.....	116

Figura 28. Electroforesis Cm5/Cm6 del 03 de agosto del 2011.....	117
Figura 29. Electroforesis de controles Cm5/Cm6 del 12 de agosto del 2011..	117

LISTA DE CUADROS EN CONTENIDO

Cuadro 1. Características para diferenciar <i>C. michiganensis</i>	14
Cuadro 2. Países con <i>Clavibacter michiganensis</i> ,	19
Cuadro 3. Resultados de identificación bacteriana	55
Cuadro 4. Identidad de las muestras.....	58
Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y amplificaciones.....	93
Cuadro 6. Secuencias de cebadores para pruebas moleculares	110
Cuadro 7. Listado de semillas a utilizar.	110
Cuadro 8. Listado del muestras.	110

RESUMEN

Las técnicas moleculares para estudio e identificación de bacterias están altamente desarrolladas para las bacterias tipo Gram-negativas. Sin embargo, dichas técnicas no funcionan en bacterias Gram-positivas. Las técnicas microbiológicas convencionales no son lo suficientemente específicas para la identificación de estas bacterias, es por ello, que las técnicas de extracción y amplificación de genes en Gram-positivas son foco actual de investigación. Adicionalmente, varias bacterias Gram-positivas son patógenas de plantas, siendo la más importante *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* que causa de la marchitez bacteriana del tomate. Esta enfermedad fue reportada en Guatemala en octubre del año 2009, cuando se reportó como causa grandes pérdidas para los agricultores de tomate de invernadero. Actualmente, a nivel mundial, no existe una manera eficiente y rápida de detección de dicha bacteria, ni mucho menos un tratamiento o alguna variedad de tomate resistente a ella. Los síntomas asociados a *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* incluyen marchitamiento, presencia de frutos con llagas, degradación de las paredes de los haces vasculares y la muerte del tomate. De acuerdo con la EPPO (2006), esta bacteria está categorizada como cuarentenada debido a su alta virulencia, ya que es capaz de transmitirse mediante cortes en la planta, heridas e incluso existen reportes de infección facilitada en estomas. La virulencia de esta enfermedad es debido a la presencia de dos plásmidos (pCM1 y pCM2) portadores de factores de virulencia, siendo en pCM1 una endonucleasa y en pCM2 la región *pat-1*. Estos plásmidos pueden ser transmitidos a otras cepas, y actualmente se estudia la posibilidad de su transmisión a diferentes especies.

Es por ello, y sumado a las pérdidas en el cultivo de tomate, que este trabajo tiene como objetivo la identificación de bacterias Gram-positivo presentes en tejido de tomate, con especial énfasis en *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*; seguido por la innovación de un método de diagnóstico que integre las técnicas de microbiología convencional, biología molecular y de bioinformática para poder proveer a los agricultores de un método de diagnóstico eficiente, confiable, riguroso y accesible.

I. INTRODUCCIÓN

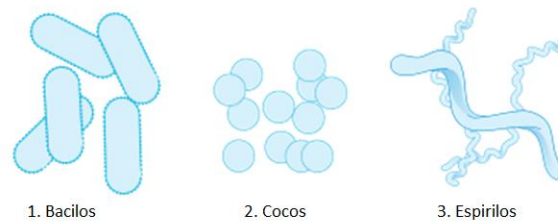
A. ANTECEDENTES

1. SECCIÓN I: SOBRE BACTERIAS

a. Clasificación: La mayoría de microbiólogos y personas que trabajan con bacterias las clasifican de acuerdo al sistema de clasificación filogenético basado en “*El manual de Bacteriología Sistemática de Bergey’s*” (Título original: *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology – Bergey’s Manual -*), manual que es una guía para distinguir las especies bacterianas basándose en diferencias fenotípicas. A pesar de ello, las bacterias pueden ser clasificadas de diferentes formas, utilizando como características diagnósticas su forma, estructura de la pared celular y tinción Gram, entre otras (Slonczewski y Foster 2010, Pommerville 2010, Talaro 2008, Thiel 1999).

b. Clasificación de bacterias por forma: Los tipos de células bacterianas pueden variar en forma, y de acuerdo a ello se pueden clasificar en cocos (esféricos), bacilos (cilíndricos, forma de varilla), espirilos (espirales o helicoidales), y filamentosos (formas complejas) (Ver Figura 1). La forma de la célula afecta su supervivencia y su actividad en el ambiente. Por ejemplo, los cocos poseen menor área superficial por volumen que los bacilos o los espirilos, y por lo tanto pueden sobrevivir desecaciones o deshidrataciones más severas. Otro ejemplo son los bacilos, que poseen un área superficial mayor a la tasa de volumen, y pueden obtener nutrientes más eficientemente de soluciones diluidas (Slonczewski y Foster 2010, Pommerville 2010, Talaro 2008, Thiel 1999).

Figura 1 Morfología Bacteriana. En esta figura se puede observar las principales formas morfológicas bacterias, donde 1. Bacilos, son bacterias que poseen forma de bastón, 2. Cocos, bacterias que poseen forma circular y, 3. Espirilos, bacterias con forma en algún grado espiral.

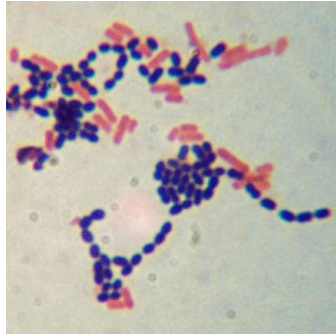


Tomado de: Slonczewski y Foster 2010.

La forma de la célula bacteriana también afecta la motilidad. Los espirilos son células espirales, que se mueven en forma de un “descorchador”, y encuentran menos resistencia del ambiente acuoso que la rodea. Ejemplos de bacterias clasificadas por forma: Cocos – *Streptococcus*, *Staphylococcus*; Bacilos: *Bacillus*, *Clostridium*; Espirilos – *Treponema*; y finalmente filamentosos – *Leptothrix*, *Crenothrix* (Slonczewski y Foster 2010, Pommerville 2010, Talaro 2008, Thiel 1999).

c. Clasificación de bacterias por la estructura de la pared celular: Otra forma de clasificar bacterias está basado en diferencias en la composición de la pared celular. Esta diferencia se hace evidente mediante la técnica denominada como tinción Gram, que permite la diferenciación entre bacterias Gram-positivo y Gram-negativo (ver Figura 2). La tinción utilizada para discriminar a las bacterias según la composición de su pared celular está nombrada en honor a H.C.J. Gram, el médico danés que inventó el procedimiento de tinción en 1884. Como resultado de dicha tinción, las bacterias Gram-positivo mantienen el tinte y se colorean de púrpura o morado ya que éstas poseen una pared celular más gruesa que las Gram-negativo. El saber si las bacterias que causan cierta patología son Gram-positivo o negativo, ayuda a que el investigador (o médico) pueda tomar las medidas adecuadas para identificarla o incluso combatirla, en el caso de bacterias patógenas. (Slonczewski y Foster 2010, Pommerville 2010, Talaro 2008, Thiel 1999).

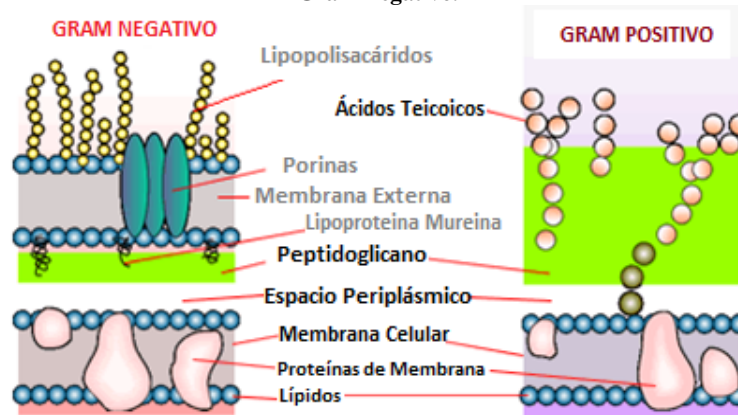
Figura 2. Tinción Gram. En esta figura se puede observar el resultado en la tinción Gram de diferentes bacterias. Las teñidas de color morado son bacterias Gram-positivo y las teñidas de color rosado son bacterias Gram-negativo.



Tomado de: Slonczewski y Foster 2010; Pommerville 2010; Talaro 2008 y Thiel 1999.

d. Diferencias en la pared celular de las bacterias Gram-positivo y Gram-negativo: Tanto organismos Gram-positivo como Gram-negativo poseen más de una capa que protege su citoplasma y su núcleo del ambiente extracelular. Estas capas protectoras son diferentes de las células animales que poseen una sola membrana citoplasmática hecha de una doble capa de fosfolípidos. La capa que se encuentra en la parte externa del citoplasma bacteriano, o membrana plasmática, se denomina la capa de peptidoglicano (ver Figura 3). El peptidoglicano es lo que le da a ambos tipos de pared celular (Gram-positivo y Gram-negativo) sus cualidades de rigidez y protección (Slonczewski y Foster 2010, Pommerville 2010, Talaro 2008, Thiel 1999). Las bacterias Gram-positivo poseen una pared celular más simple pero más gruesa, con cantidades relativamente grandes de peptidoglicano. Las paredes de los organismos Gram-negativo son más delgadas y poseen menos peptidoglicano pero son estructuralmente más complejas (Pommerville 2010). Una membrana externa en la pared celular de los organismos Gram-negativo posee lipopolisacáridos (LPS). Estas sustancias son tóxicas y son las sustancias responsables por hacer que los organismos Gram-negativos sean más peligrosos que los Gram-positivo. Incluso los LPS de organismos muertos representan una amenaza potencial (Slonczewski y Foster 2010, Pommerville 2010, Talaro 2008, Thiel 1999).

Figura 3. Estructura de la pared celular de un organismo Gram-positivo en comparación con la de un organismo Gram-negativo. En la parte derecha de la figura se observa la estructura de la pared celular tipo Gram-positivo, que consiste de ácidos teicoicos, peptidoglicano, espacio periplásmico, membrana celular, proteínas de membrana y lípidos. En la parte izquierda, con fines de comparación, se ilustra la estructura más compleja de un organismos Gram-negativo.



Tomado de: Slonczewski y Foster 2010; Pommerville 2010; Talaro 2008 y Thiel 1999.

2. SECCIÓN II: SOBRE BACTERIAS GRAM-POSITIVO: Las bacterias Gram-positivo poseen una envoltura celular compuesta de dos capas: (a) una pared celular externa, que es una capa gruesa compuesta de moléculas de peptidoglicano entrecruzadas, ácidos teicoicos, polisacáridos y otras proteínas. (b) Membrana citoplasmática, que posee proteínas que comprende la bicapa lipídica (Slonczewski y Foster 2010, Pommerville 2010, Talaro 2008, Thiel 1999).

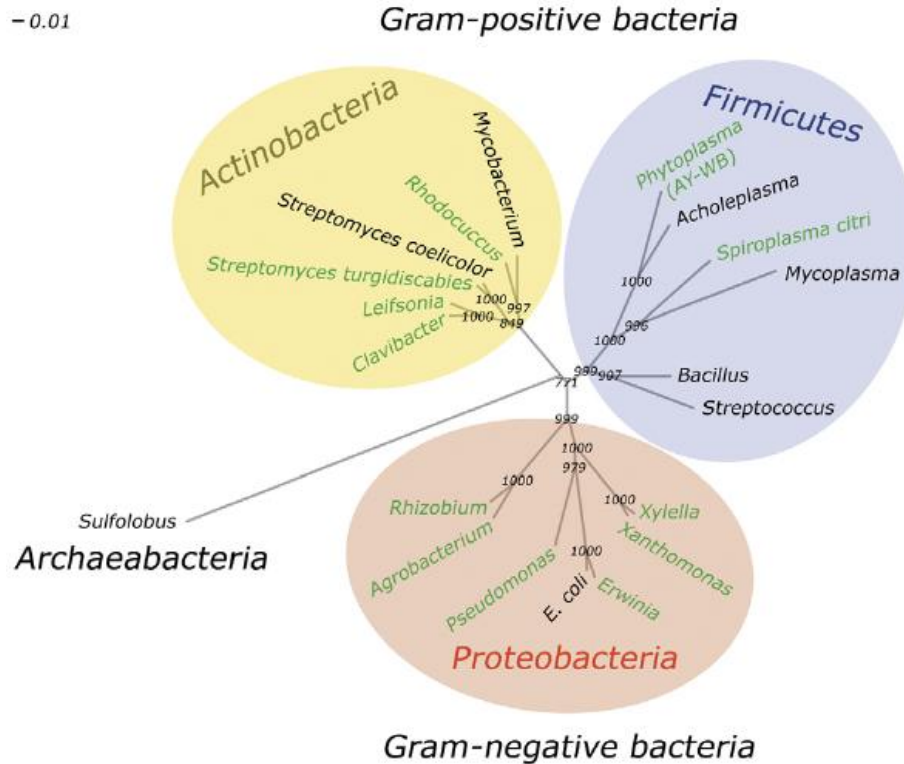
a. **Componentes esenciales de las bacterias Gram-positivo:** Las principales son los ácidos teicoicos y los polisacáridos. Los ácidos teicoicos anclan la pared celular externa con la membrana citoplasmáticas al adherirse a glicolípidos (ver Figura 3). Los ácidos teicoicos también actúan como determinantes antigénicos, por lo que son importantes para identificaciones serológicas de muchos organismos Gram-positivo. Ejemplos de organismos Gram-positivo son: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y las bacterias del género *Clavibacter* (Slonczewski y Foster 2010, Pommerville 2010, Talaro 2008, Thiel 1999).

b. **Patogenicidad de las bacterias Gram-positivo:** De acuerdo con De la Isla (1994) y Smith *et al.* (1992), únicamente las bacterias Gram-positivo del género *Corynebacterium* (género al que antiguamente pertenecía *C. mighiganensis*) son patógenas

de plantas. Debido a la complejidad de biota microbiana del suelo, Wild (1992) reporta que, aunque en menor proporción con respecto a las bacterias Gram-negativo, se pueden encontrar otras bacterias Gram-positivo como habitantes naturales del suelo (inclusive bacterias no patógenas). La observación directa de la flora bacteriana edáfica muestra, de acuerdo con Wild (1992) que en casi todos los suelos predominan los cocos pequeños y los bacilos cortos. Racimos de cocos o bacilos cocoides pueden obtenerse de muestreos de suelo. Las bacterias Gram-positivo más comúnmente encontradas en el suelo corresponden a bacterias de los géneros: *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Bacillus* y *Clostridium* (Wild 1992).

Investigaciones en patogenicidad de bacterias Gram-positivo en plantas han resultado en el descubrimiento y caracterización de nuevos determinantes de virulencia. La distancia filogenética y las diferencias fundamentales en la estructura celular entre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas predice que estas bacterias no comparten genes de patogenicidad en plantas que hayan sido transferidos verticalmente (Hogenhout y Loria 2008). Los dos clados que componen el grupo de las bacterias Gram-positivo, las Actinobacterias (alta cantidad de C + G) y los Firmicutes (baja cantidad de G + C) divergieron tempranamente en la historia evolutiva (ver Figura 4) sugiriendo que es poco probable que estos filos compartan loci ancestrales de patogenicidad en sus genes. Recientes avances en genética y genómica molecular de la patogenicidad en plantas apoyan la idea de un modelo de virulencia específico de género, logrado a través de transferencia horizontal de genes (Hogenhout y Loria 2008). En contraste con las Firmicutes, los géneros *Clavibacter* y *Leifsonia* de Actinobacteria son hospedero-específicos a nivel de especie y subespecie (Hogenhout y Loria 2008).

Figura 4. Diagrama de la historia evolutiva de las bacterias Gram-positivo. Las Actinobacterias, Firmicutes y Protobacteria divergieron tempranamente en la historia evolutiva. Secuencias del gen 16S de ARN ribosomal de especies representativas fueron comparadas utilizando Neighbor Joining , dando como resultado el diagrama de esta figura.



Tomado de: Hogenhout y Loria 2008.

c. Factores de virulencia: Pequeñas moléculas derivadas de patógenos poseen un papel crucial en la patogenicidad mediada por la manipulación del metabolismo y señalización de la planta. La toxina mejor caracterizada producida por patógenos Gram-positivo en plantas es la Thaxtomina A, que es una citoquina altamente modificada y principal inhibidor de la biosíntesis de celulosa (Hogenhout y Loria 2008). Su biosíntesis sigue las rutas de péptidos no ribosomales e incluye la óxido-nítrico (NO) sintasa; el NO es utilizado en la nitración de triptófano y es liberado en la interfase hospedero-patógeno para que esté disponible para modular la señalización del hospedero. La Thaxtomina A inhibe la síntesis de celulosa en células vegetales en expansión vía un mecanismo desconocido que parece ser conservado entre las plantas superiores (Hogenhout y Loria 2008).

Thaxtomina y NO son inducidos por celobiosa, que es un ligando para el TxtR de la familia AraC/Xyle. Aparentemente la celobiosa es una señal para expandir el tejido vegetal. El operón *fas* en *R. fascians* es un ejemplo interesante de una ruta altamente

regulada que produce una citoquinina modificada y que es absolutamente requerida para la virulencia de este patógeno. Interesantemente, el operón *fas* también existe en el PAI (Plasminogen activator inhibitor, oficialmente nombrado Serpine) de *S. trugidiscabies*; confiere en este patógeno de suelo la habilidad de producir irritación en las partes aéreas de las plantas (Hogenhout y Loria 2008).

d. Transferencia horizontal de genes: Estudios genéticos en organismos Gram-positivo revelan la importancia de la transferencia lateral de genes (HGT, por sus siglas en inglés: Horizontal Gene Transfer) en la evolución de la virulencia en Actinobacteria y Firmicutes. En el caso de *Clavibactermichiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), el gen *pat-1* que es requerido para virulencia está contenido en plásmidos (Hogenhout y Loria 2008) y el gen *tomA* está localizado en una región de 129 kb con menor contenido de G + C que el resto del genoma. Esta región también codifica varias serin-proteasas requeridas para la virulencia. El gen *tomA*, que se cree está involucrado en la supresión de defensas en las plantas, es homólogo al PAI de *S. turgidiscabies*. Este PAI reside en un elemento integral de 660 kb, que también codifica la ruta biosintética de la Thaxtomina, los operones *necl* y *fas*, y es capaz de movilizarse a otras especies de *Streptomyces*. El genoma de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* posee cuatro regiones HGT que codifican pectinasas y poligalacturonasas, y una región HGT de 50 kb que posee un homólogo del gen *celA* (Hogenhout y Loria 2008).

Muchos de los modelos de virulencia dependientes de transferencia horizontal de genes han sido estudiados en fitoplasmas y han tenido gran utilidad para determinar su importancia y frecuencia, especialmente dentro del grupo de bacterias Gram-positivo. Los genomas de fitoplasmas poseen muchas secuencias repetitivas que están organizadas en clústeres semejantes a transposones compuestos denominados unidades móviles potenciales (potential mobile units, PMU's). Los PMU's poseen un tamaño de aproximadamente 20 kb y poseen genes para factores de transcripción especializados, como *sigF*; factores de replicación de ADN, como *dnaB* y *dnaG*; factores de síntesis de ADN, como *tmk*, factores de recombinación de ADN, como *ssb* y *himA*, proteínas dirigidas a la membrana y *tra5* que es una secuencia de inserción de la familia *IS3* codificando un *orfAB* (transposasa de fusión) completa (Hogenhout y Loria 2008). El genoma de los fitoplasmas posee muchas

copias de PMU's y clústeres parecidos a los PMU's, siendo ambos, prevalentes en regiones de 500 kb en sus cromosomas pero ausentes en regiones de 250 kb del cromosoma que contienen predominantemente genes para importantes funciones metabólicas. Los clústeres parecen ser versiones degeneradas de los PMU's. Algunas regiones parecidas a los PMU's codifican pequeñas proteínas de secreción, de las cuales una es candidata para virulencia: La SAP11 (Hogenhout y Loria 2008).

Como conclusión de este tema, Hogenhout y Loria (2008) mencionan que tanto Actinobacteria y Firmicutes han evolucionado estrategias exclusivas para la patogenicidad vegetal, siendo ambas independientes a las de Proteobacteria. Nuevos factores de virulencia, incluyendo la Thaxtamina y la familia de serin-proteasas han sido caracterizados. También existe abundante evidencia de la adquisición de genes de virulencia a través de HGT, así como, la existencia de varios ejemplos de varios genes homólogos de virulencia presentes en múltiples géneros. Los movimientos de PAI's y PMU's a través de las especies ocurre, y al menos en algunos casos, puede ser suficiente para el surgimiento de nuevas especies patogénicas. También se han descubierto nuevas toxinas, proteínas secretadas y hormonas vegetales en Fitoplasmas y Spiroplasmas, que sirven para manipular rutas de metabolismo y de defensa en las plantas mediante un mecanismo aún desconocido. La semejanza más importante entre este grupo tan diverso de organismos Gram-positivo patógenos de plantas es que están muy pobremente estudiados y todos poseen impresionantes sistemas de patogenicidad (Hogenhout y Loria 2008).

3. SECCIÓN III: ARNr 16S EN LA IDENTIFICACIÓN BACTERIANA: La identificación bacteriana por una variedad de métodos se ha convertido en una herramienta esencial de diagnóstico en áreas de salud y agricultura (O'Hara *et al.* 1993, Relman 1998, Tanner *et al.* 2000). Tradicionalmente, los microbiólogos que llevan a cabo la identificación bacteriana, han confiado en el cultivo de organismos, a pesar de que la mayoría no se cultiva con medios estándares. Más recientemente, los métodos moleculares han sido desarrollados para examinar la diversidad de microorganismos sin la necesidad de aislarlos y cultivarlos (Tanner *et al.* 2000).

Una de estas metodologías utiliza la naturaleza conservada de la síntesis de proteínas en todos los organismos. Con cerca de 10,000 secuencias completas o parciales hoy en día disponibles para comparación, el ARN ribosomal (ARNr) de la subunidad pequeña 16S es la molécula preferida para identificar bacterias y otros microorganismos a nivel de especie (Tanner *et al.* 2000). Las estrategias moleculares basadas en sondas, PCR, clonación y secuenciación han permitido a los biólogos examinar el total de una comunidad bacteriana en una muestra, sin ningún conocimiento *a priori* de las especies presentes en la muestra (Amann *et al.* 1995, Tanner *et al.* 2000). En la mayoría de los casos, todas las copias de un organismo de la subunidad 16S ARNr son idénticas o casi idénticas (Rodicio y Mendoza 2004). A pesar de que la identificación basada en ARNr es solamente precisa hasta aproximadamente nivel de especie, su tremenda versatilidad la hace extremadamente valiosa para escaneos rápidos e identificación de microorganismos (Tanner *et al.* 2000).

La información obtenida mediante la comparación de secuencias del gen ARNr 16S puede ser utilizada para deducir detalladamente las relaciones filogenéticas basadas en la evolución. Debido a sus porciones altamente conservadas, el gen ARNr 16S es ideal para el diseño de cebadores que amplificarán esta subunidad de genes ARNr de todos los dominios de la vida (Tanner *et al.* 2000). Por otra parte, los cebadores pueden ser diseñados para regiones altamente variables del mismo gen ARNr 16S y así amplificar la región correspondiente a una especie o género en particular. También se ha utilizado PCR para amplificar el ARNr 16S de microorganismos aislados de ambientes altamente diversos y extremos (Tanner *et al.* 2000).

Desde su proposición como cronómetro molecular a principios de la década de 1970 por Carl Woese, el análisis de los ARNr 16S se ha utilizado ampliamente para establecer las relaciones filogenéticas dentro del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución y, como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana (Rodicio y Mendoza 2004). Actualmente, el gen de ARNr 16S es el gen diana más utilizado en estudios de diversidad bacteriana. Este gen es un marcador universal relativamente poco afectado por las presiones ambientales además de que posee una función esencial en la síntesis de proteínas. Sin embargo, el uso de este gen puede presentar

ciertas desventajas debido a que es tan conservado que no permite distinguir con precisión entre algunas especies bacterianas (Le Borgne 2005). Además, puede estar presente en más de una copia, lo que dificulta la cuantificación de las especies en comunidades complejas. Estas copias intragenómicas pueden diferir en secuencia, conllevando a la identificación de varios ribotipos para un solo organismo (Case *et al.* 2007). En consecuencia, algunas especies bacterianas pueden estar sobre o subestimadas. En el campo de diagnóstico microbiológico molecular, puede ser utilizado solamente cuando los organismos a evidenciar son suficientemente diferentes (Le Borgne 2005). En patología microbiana, la identificación molecular basada en ARNr 16S se utiliza fundamentalmente para bacterias cuya identificación mediante otro tipo de técnicas resulta imposible, difícil o requiere mucho tiempo. A su vez, en el mismo campo, la identificación rápida y correcta de los agentes patógenos es un requisito esencial para el diagnóstico y la aplicación posterior de un tratamiento adecuado (Rodicio y Mendoza 2004).

a. ARNr 16S: Es un polirribonucleótido con un tamaño aproximado de 1,500 nt, codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ARNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica (Case *et al.* 2007, Rodicio y Mendoza 2004). Como cualquier secuencia de nucleótidos de cadena sencilla, el ARNr 16S se pliega en una estructura secundaria caracterizada por la presencia de segmentos de doble hebra, alternando con regiones de simple hebra. Dado que este tipo de ARNr procede de subunidades pequeñas de los ribosomas, su acrónimo es ARNr SSU (del inglés, Small SubUnit). Los ARNr SSU se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen además variaciones que se concentran en zonas específicas (Case *et al.* 2007, Rodicio y Mendoza 2004). Estos genes poseen la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma. Se trata de secuencias específicas cortas que aparecen en todos (o la mayor parte de) los miembros de un determinado grupo filogenético, y nunca (o solo raramente) están presentes en otros grupos, incluidos los más próximos. Por ello, los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su grupo (Rodicio y Mendoza 2004).

b. ARNr 16S como herramienta filogenética y taxonómica: Existen varias razones por las cuales, a pesar de haber cronómetros moleculares alternativos, el ARNr 16S está tan arraigado a los análisis taxonómicos y filogenéticos. Dentro de las principales características que han permitido que la molécula de ARNr 16S se haya convertido en un importante marcador molecular están: (1) Es una molécula muy antigua y está presente en todos los organismos actuales; (2) su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios; (3) los cambios ocurren de manera suficientemente lenta como para aportar información acerca de todos los procariotas; (4) el tamaño relativamente largo de los ARNr 16S (1500 nt) minimiza las fluctuaciones estadísticas; (5) la conservación de la estructura secundaria puede servir de ayuda en las comparaciones, aportando una base para el alineamiento preciso y; (6) dado que resulta relativamente fácil secuenciar los ARNr 16S, existen bases de datos amplias y en continuo crecimiento (Rodicio y Mendoza 2004).

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los ARNr 16S de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva. Además, el análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados. Hay que tener en cuenta, no obstante, que es la comparación de genomas completos, y no la comparación de los ARNr 16S, la que aporta una indicación exacta de las relaciones evolutivas. Es importante saber que especie bacteriana se define, en taxonomía, como el conjunto de cepas que comparten una similitud del 70% o más, en experimentos de reasociación ADN-ADN (Stackebrandt y Goebel 1994, Rodicio y Mendoza 2004). En taxonomía e identificación bacteriana se recomienda la identificación polifásica, que utiliza criterios fenotípicos junto con datos de secuenciación. En patología microbiana, eso significa que la secuenciación de ARNr 16S no aportará siempre una identificación definitiva a nivel de especie (Rodicio y Mendoza 2004).

c. ARNr 16S en *Clavibacter michiganensis* (Cm): Generalmente se realiza la técnica de PCR para el análisis de las secuencias de ARNr 16S, no sólo para identificar la bacteria, sino para determinar la virulencia de las cepas catalogadas como: virulentas, hipovirulentas y no-virulentas (Kaneshiro *et al.* 2006). La mayoría de colonias poseen típica morfología descrita para esta bacteria, sin embargo, algunas han sido descritas con morfología muy diferente. Es por ello, que se ha utilizado ARNr 16S para comprobar la especie de la bacteria (Kaneshiro *et al.* 2006). Como se menciona anteriormente, existe problema con la identificación de bacterias muy relacionadas a nivel de género (entre especies), por lo que no es de esperar, que la identificación mediante ARNr 16S haya podido determinar los taxa hasta especie, sin embargo, no ha podido hacerse mucho para poder diferenciar entre las diferentes subespecies (Kaneshiro *et al.* 2006). Adicionalmente a la secuenciación de ARNr 16S, es requerido un procedimiento que pueda dar más información acerca de las subespecies, por ejemplo, análisis de plásmidos y descripción morfológica sumados a pruebas de inoculación.

4. SECCIÓN IV: BACTERIAS *Clavibacter michiganensis*: A pesar de que los virus y los hongos pueden ser considerados como los patógenos vegetales más importantes, infecciones por medio de fitopatógenos bacterianos también causan significantes pérdidas en la agricultura. La fitopatogenicidad no es una tendencia ampliamente distribuida dentro de las bacterias, existiendo solamente algunos géneros de bacterias patogénicas a plantas (Gnanamanickam 2006; Ciancio y Mukerji 2010). Durante las últimas dos décadas, importantes estudios han ayudado a comprender los mecanismos moleculares de interacción patógena entre bacteria y planta, sin embargo, este progreso se ha orientado principalmente a bacterias fitopatógenas del grupo Gram-negativo. A diferencia de éstas últimas, las bacterias Gram-positivo fitopatógenas son más escasas aún; debido a lo anterior, las técnicas moleculares para su detección y estudio están pobremente desarrolladas (Gnanamanickam 2006, Ciancio y Mukerji 2010).

Otro problema adicional para el estudio de las bacterias Gram-positivo patógenas es el hecho de que son más difíciles de manejar y manipular, a pesar de que muchas son importantes ya que causan grandes pérdidas en los cultivos. Uno de estos ejemplos son las bacterias del género *Clavibacter* (Gnanamanickam 2006, Ciancio y Mukerji 2010). Las bacterias del género *Clavibacter* pertenecen al grupo de bacterias Actinomycetes Gram-positivo, de la familia Microbacteriaceae. Este género consiste de una sola especie, *Clavibacter michiganensis* que es fitopatógena y está subdividida en cinco subespecies dependiendo su especificidad a infectar determinado hospedero: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) causa el marchitamiento y chancro del tomate (*Solanum lycopersicum*) y puede ser considerada como la enfermedad bacteriana del tomate más importante. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) es responsable de la enfermedad “podredumbre anular” de la papa (*Solanum tuberosum*). *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (*Cmi*) que causa el marchitamiento en la alfalfa (Gnanamanickam 2006, Ciancio y Mukerji 2010).

La comparación entre genomas de diferentes subespecies de *Clavibactermichiganensis* muestra una diversidad substancial del contenido genético entre subespecies, aparentemente debido por las diferencias en la ecología de las subespecies (Hogenhout y Loria 2008). La importancia de las tres subespecies de fitopatógenos anteriormente mencionadas reside en que la European Union Plant Health Legislation los considera como patógenos de cuarentena; siendo éste el mismo caso en muchos otros países. Otras subespecies importantes son *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (*Cmn*) que produce el marchitamiento del maíz (*Zea mays*); y *Clavibacter michiganensis* subsp. *tessellarius* (*Cmt*) que causa el mosaico bacteriano del trigo (*Triicum aestivum*) (Gnanamanickam 2006, Ciancio y Mukerji 2010). Datos sobre los mecanismos moleculares de inducción de enfermedad están disponibles principalmente para *Cmm*; incluso se ha desarrollado vectores de clonación, sistemas eficientes de transformación y transposones que pueden ser utilizados para cualquier otra subespecie. De esta manera se determinó que en *Cmm*, la los factores de virulencia *pat-1* y *celA* son codificados por plásmidos. Más aún, se pudo demostrar que *celA* también es un factor de virulencia en *Cms* (Gnanamanickam 2006, Ciancio y Mukerji 2010).

a. Fisiología: Esta bacteria es mesófila con una temperatura óptima de 25 a 28°C. El tiempo de generación es alto y requiere de tres a cuatro días para que se formen colonias visibles en placas con agar. La temperatura máxima de crecimiento es aproximadamente de 35°C. El punto de muerte térmica está cercano a 50 °C (Gnanamanickam 2006). El pH óptimo se encuentra entre 7 y 8, pero el crecimiento puede ocurrir en pH tan bajo como 5, lo que es importante para el crecimiento de la bacteria dentro de los vasos del xilema (Gnanamanickam 2006). No ocurre ni reducción de nitrato ni de nitrito. La celulosa y otros polisacáridos contribuyen a su crecimiento y se ha reportado capacidad moderada de actividad proteolítica (Gnanamanickam 2006). El Cuadro 1 muestra importantes características diferenciales de las subespecies de *Cm*.

Cuadro 1. Características seleccionadas para diferenciar entre las subespecies de *C. michiganensis*. Este cuadro resume las características diagnósticas de las diferentes subespecies de *Cm*. El “+” indica que dicha característica está presente, el “-“ indica la ausencia de la característica en cuestión. Finalmente, las celdas sin ninguna indicación de presencia o ausencia de la característica es debido, probablemente, a la falta de información de la subespecie determinada.

Subespecie	Pigmentación	Licuefacción de Gelatina	Uso de Acetato	Reducción de la producción de Azúcar	Producción de Levan
<i>Cmm</i>	Amarilla	+	+	+	-
<i>Cms</i>	Blanca	-	+	-	-
<i>Cmi</i>	Azul-Grisáceo (amarilla)	-	-		-
<i>Cmn</i>	Naranja	-	+	+	+
<i>Cmt</i>	Naranja		-		

Tomado de: Gnanamanickam 2006.

b. Plantas hospederas: Las subespecies de *Cm* son altamente específicas al infectar plantas hospederas y algunas pocas especies de plantas cercanamente relacionadas a las mismas. Incluso, mediante inoculación artificial, se puede dar infección no específica, en donde la planta infectada es del mismo género o familia que la planta hospedera (Gnanamanickam 2006). En algunas especies de plantas hospederas, esto conlleva al desarrollo de los síntomas de la enfermedad, sin embargo, la infección sin ningún síntoma

visible es común y ocurre, también, en la planta hospedera principal (Gnanamanickam 2006).

c. Modo de infección: Las subespecies de *Cm* son principalmente patógenas de heridas. A pesar de que existen varios resultados conflictivos en la literatura sobre la forma de infección, *Cm* parece ser un patógeno muy efectivo. En varias subespecies se ha encontrado que existe correlación entre la severidad de los síntomas y el tamaño de la herida por la que infectan la planta (Gnanamanickam 2006). La infección es más efectiva si existen heridas cerca del xilema, sin embargo, también puede existir infección mediante cualquier otra herida, incluso a través de las hojas (Strider 1969). También se ha reportado que para semillas contaminadas, existe una baja tasa de infección, pero se reportaron infecciones secundarias (Strider 1969). Esto sugiere que las defensas de las plantas no son inducidas (probablemente debido a supresión de las mismas por parte del patógeno) o son efectivamente evitadas (Gnanamanickam 2006).

El conocimiento acerca de la estructura y diversidad natural de las poblaciones de *Cm* es restringido, y la importancia relativa de los diferentes modos de infección es confusa. Se desconoce la importancia relativa de las epidemias causadas por medio de semillas contaminadas (producto de empresas dedicadas a su distribución), con respecto a las causadas por cepas originadas en el lugar de siembra (nativas; por ejemplo por medio de cepas existentes en el suelo o infecciones latentes de otras plantas hospederas). También se desconoce si las grandes epidemias son causadas solamente por una cepa presente en el lugar (infección secundaria), o si varias cepas diferentes están involucradas (Gnanamanickam 2006). La infección a través de vectores animales jamás ha sido descrita para las subespecies de *Cm*, a pesar de que la severidad de la enfermedad puede estar influida por la presencia de nemátodos (Hunt *et al.* 1971, Gnanamanickam 2006).

d. Vida dentro de la planta: Todas las subespecies de *Cm* son patógenos vegetales vasculares que causan infecciones sistémicas y características (Gnanamanickam 2006). Son biotróficas; viven y se multiplican principalmente dentro de la planta hospedera. El hábitat principal es el fluido del xilema, pobre en nutrientes y levemente ácido. Luego de la

infección, *Cm* se esparce por los vasos del xilema (Gnanamanickam 2006). Solamente a etapas tardías de infección, algunas subespecies dejan los vasos del xilema y entran en los tejidos circundantes luego de la degradación de las paredes de las células de la planta, lo que conlleva a maceraciones del tejido (Marte 1980, Benhamou 1991, Baer y Gudmestad 1995, Gnanamanickam 2006). Esto parece ser causado por la producción de enzimas encargadas de la degradación de la pared celular, como celulasa, poligalacturonasa y xilanasa. *Cm* es capaz de producir algunas hormonas vegetales; sin embargo, su papel en el desarrollo de síntomas no está claro (Marte 1980, Benhamou 1991, Baer y Gudmestad 1995, Gnanamanickam 2006).

Una característica general de las enfermedades causadas por *Cm* es la presencia de plantas con infección latente y carencia de síntomas. Estas plantas pueden ser la fuente de reinfección o de esparcimiento de las enfermedades, especialmente si se utilizan trasplantes (Frank 1999, Gnanamanickam 2006). A su vez, la infección de las semillas parece ser una característica general de *Cm*, hecho que ha sido reportado para la mayoría de sus subespecies. Permanece en la semilla, entre la chalaza (que es el tejido fino donde se ensamblan los integumentos y la nucela) y el endospermo, y cercano al embrión. La transmisión de la enfermedad a través de semillas contaminadas ha sido demostrada, sin embargo, con una baja eficiencia de infección si se carece de altas titulaciones bacterianas. No obstante, Gnanamanickam (2006) indica que una alta tasa de infección puede ser obtenida debido a infecciones secundarias, sin embargo, no menciona cómo.

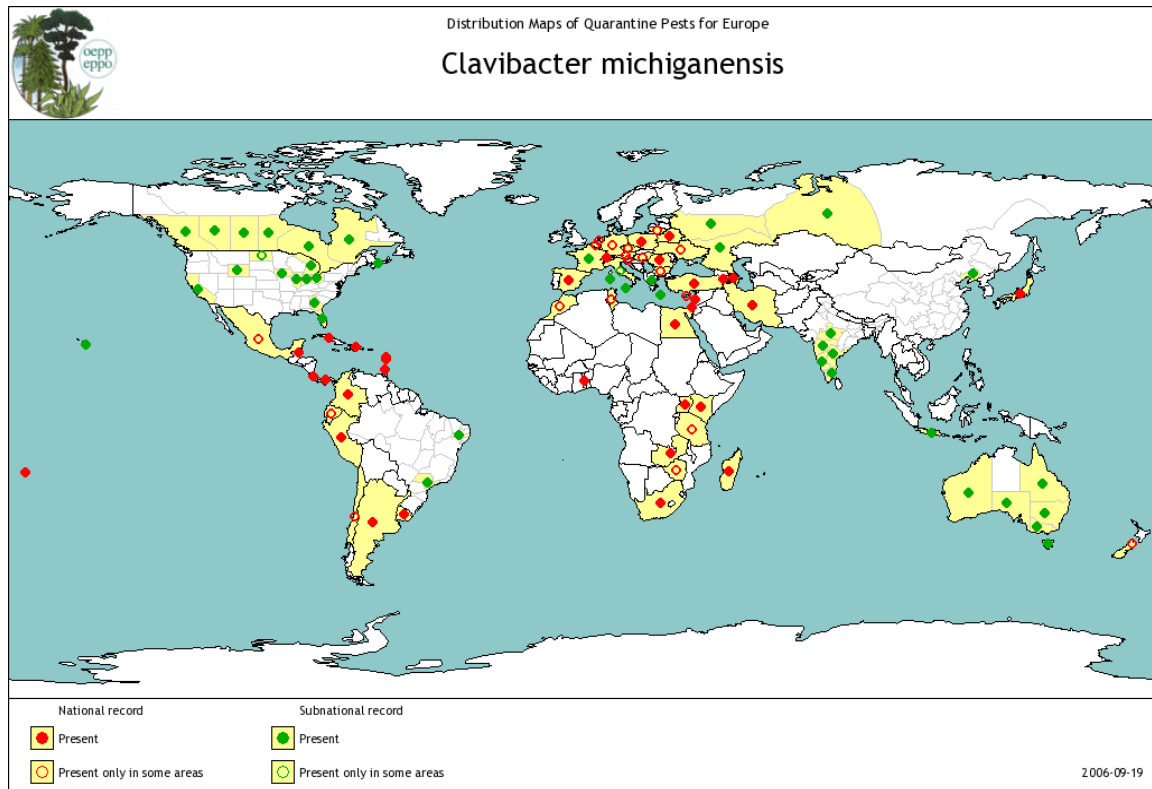
e. Polisacáridos extracelulares (EPS, extracelular polysaccharides): Muchas cepas de *Cm* producen exopolisacáridos (EPS), que son sustancias conocidas por tener un número diverso de funciones, entre las cuales se encuentran, las funciones relacionadas con patogenicidad. Todas sus subespecies producen alta diversidad de EPS, sin embargo, la cantidad varía dependiendo de la cepa, el medio de cultivo y las condiciones de crecimiento (Gnanamanickam 2006). Se ha propuesto una función directa de los EPS en la virulencia; sugiriendo que los EPS actúan directamente en la virulencia como una toxina. Rai y Strobel (1969) y Strobel (1970) reportaron efectos fitotóxicos (como la inducción de marchitamiento) al exponer cortes epicótilos a los EPS de alto peso molecular aislados de

varias de las subespecies de *Cm*. Sin embargo, existen discrepancias en cuanto a estos reportes, ya que los mutantes de *Cm* (conteniendo menores cantidades de EPS y/o conteniendo composiciones alteradas de azúcares) estudiados durante investigaciones posteriores, no afectaron el desarrollo de síntomas o colonización de las bacterias en la planta, por lo que se puso en duda la hipótesis de la participación directa de los EPS (Bermpohl *et al.* 1996, Paschke y Van Alfen 1993, Westra y Slack 1992, Gnanamanickam 2006). Hoy en día, el modelo de Van Alfen *et al.* (1987) es el más aceptado para explicar los síntomas de la enfermedad causada por *Cm*. En este modelo, se propone que los EPS interfieren con el transporte de agua debido a la obstrucción física de los vasos del xilema, lo que conlleva a la reducción de biomasa, sin embargo, que los EPS no están directamente involucrados en la virulencia (Gnanamanickam 2006).

f. Distribución de *C. michiganensis*: La distribución de esta especie es amplia, y el mapa mostrado a continuación (Figura5) toma en cuenta todas sus subespecies.

g. Factores de virulencia: Las proteínas secretadas que actúan dentro de las células vegetales son indispensables para la patogénesis microbiana. La falta de un sistema de secreción proteica tipo III (TTSS) en Firmicutes y Actinobacteria, promueve inmediatamente la pregunta acerca de la entrega de proteínas de virulencia a través de la pared y membrana de las células vegetales; pregunta que todavía permanece sin respuesta (Hogenhout y Loria 2008). En *Cm*, las proteasas y celulasas secretadas parecen ser cruciales en la virulencia. Por ejemplo, *Cms* secreta una endo- β -1,4-gluconasa, *celA* que consiste en un dominio de unión de tipo celulosa y un dominio tipo expansina C-terminal. *CelA* es requerida por este patógeno para la inducción del marchitamiento. Homólogos a la *CelA* que carecen del dominio tipo expansina está presente en otros patógenos de plantas que colonizan el xilema, incluyendo *Cms*. Esto sugiere que dicha enzima cumple un papel en la degradación de la pared celular de las células del xilema (Hogenhout y Loria 2008). En contraste, *Cmm* posee Serin-proteasas codificadas por *pat-1* y múltiples genes *chp* (*Cms* contiene 11 miembros de esta familia de genes), que son determinantes factores de virulencia. Se ha especulado que estas proteínas pueden modular las defensas de la planta, así como lo hacen las cisteín-proteasas en Proteobacteria (Hogenhout y Loria 2008).

Figura 5. Mapa de distribución de *Clavibacter michiganensis*. Este mapa describe la distribución de *C. michiganensis* tomando en cuenta todas sus subespecies. Los círculos rojos (reellenos y vacíos) son datos provenientes del record nacional, mientras que los círculos verdes (reellenos y vacíos) son datos del record subnacional. Los círculos reellenos indican la presencia de C.m. en toda el área, mientras que los círculos vacíos indican la presencia en algunas áreas de Cm.



Tomado de: Eppo 2006.

Se ha descrito la presencia de plásmidos en la mayoría de cepas de *Cmi*, *Cmm*, *Cmn* y *Cms* (Gross *et al.* 1979, Gnanamanickam 2006). Sin embargo, no se ha podido asociar algún fenotipo con cualquiera de los plásmidos encontrados. Estos plásmidos están directamente involucrados en la virulencia de *Cm* (Gnanamanickam 2006).

h. Variabilidad de las cepas: Al menos para algunas características como la pigmentación y la producción de EPS, se conoce una alta variabilidad y/o la ocurrencia de variantes/mutantes (Fulkerson 1960, Gnanamanickam 2006). También para *Cmm*, *Cmn* y *Cmi* se reportó la pérdida de virulencia luego de prolongada cultivación *in vitro* (Carroll y Lukezic 1971, Schuster *et al.* 1975, Smidt y Vidaver 1987, Strider 1969, Vidaver 1977, Gnanamanickam 2006); no está claro si este es un efecto genético o fenotípico dependiente la variabilidad en medios y condiciones de crecimiento, sin embargo, se ha reportado que el paso del patógeno a través de la planta hospedera conlleva a la restauración de los fenotipos

originales. La base de la alta variabilidad genética es desconocida, pero puede deberse a la presencia de elementos activos de inserción, presentes en un número alto de copia en *Cmi* y *Cms* (Gnanamanickam 2006).

Cuadro 2. Países a nivel mundial que reportan presencia de *Clavibacter michiganensis*, tomando en cuenta todas sus subespecies. En este cuadro se presentan, por continente, los países que han reportado presencia de *Clavibacter michiganensis*. En este cuadro, la leyenda es como sigue: X, indica presencia sin detalles; A, indica presencia con distribución amplia; B, indica presencia con distribución restringida; y finalmente C, indica presencia poco frecuente.

EUROPA	CONDICIÓN	ASIA Y OCEANÍA	CONDICIÓN	ÁFRICA	CONDICIÓN	AMÉRICA	CONDICIÓN
Armenia	X	India	B	Egipto	X	Canadá	A
Austria	C	Indonesia	B	Kenya	X	México	B
Azerbaiyán	X	Irán	X	Madagascar	X	Estados Unidos	A
Bielorrusia	X	Israel	A	Marruecos	B	Belice	X
Bélgica	B	Japón	X	Sudáfrica	A	Costa Rica	X
Bulgaria	B	Líbano	X	Tanzania	B	Panamá	X
Chipre	B	Australia	A	Togo	X	Cuba	X
República Checa	C	Nueva Zelanda	V	Túnez	B	Dominica	X
Francia	A	Tonga	X	Uganda	X	República Dominicana	X
Alemania	B			Zambia	X	Granada	X
Grecia	A			Zimbabwe	B	Guadalupe	X
Hungría	B					Argentina	X
Italia	X					Brasil	X
Lituania	C					Chile	B
Holanda	C					Colombia	X
Polonia	X					Ecuador	B
Rumania	X					Perú	X
Rusia	A					Uruguay	A
Eslovenia	B						
España	X						
Suiza	A						
Turkía	A						
Ucrania	B						

Tomado de: Eppo 2006.

i. Clavibacter en suelo y como epífita: *Cm* parece ser capaz de sobrevivir en el suelo, solamente por períodos cortos (Carroll y Lukezic 1971, Gnanamanickam 2006). Mayores tiempos de sobrevivencia, en un rango de 1 a 3 años, han sido descritos cuando la bacteria está asociada con material de la planta hospedera, donde los restos de planta pueden formar una fuente de reinfección (Gnanamanickam 2006). Para *Cms*, la supervivencia en el suelo es posible solamente por un máximo de 21 días, dependiendo de las condiciones

ambientales (Van der Wolf y Van Beckhoven 2004, Gnanamanickam 2006). Adicionalmente, la presencia de la bacteria en el agua da lugar a proporciones relativamente altas de variantes y a la pérdida de virulencia (Vidaver 1977, Gnanamanickam 2006). Existen otros reservorios naturales de *Cm* pero están poco estudiados. Se han encontrado poblaciones de *Cm* en la superficie de las hojas de varias especies de plantas, por lo que se sugiere un estilo de vida epífita. La presencia de pigmentos en este género de bacterias, probablemente esté relacionado con este tipo de vida, donde le confiere ventajas, ya que se ha observado que la resistencia a UV es mayor en las bacterias pigmentadas (Jacobs *et al.* 2005, Gnanamanickam 2006). No se ha encontrado correlación entre la pigmentación y la virulencia (Gnanamanickam 2006). Reservorios adicionales de *Cm* incluyen principalmente la persistencia de esta bacteria en plantas infectadas pero carentes de síntomas. Existen hospederos alternativos (incluso en plantas no relacionadas a las plantas hospederas) que crecen cerca de su hospedero natural y que, pueden llevar a infecciones en las plantas hospederas principales encontradas en las cercanías (Gnanamanickam 2006). Se puede concluir que *Clavibacter* puede ser considerada principalmente biotrófica y pobremente necrotrófica, pero no se le puede considerar como habitante permanente en suelos.

j. Diagnóstico y biocontrol: La infección de plantas hospederas específicas por las subespecies de *Cm* inevitablemente produce enfermedad. A pesar de que parece existir diferencias en la sensibilidad a infecciones de *Cm*, hoy en día no se utiliza ningún cultivo resistente a la bacteria. Esto sugiere que el sistema de genes de avirulencia y los genes de la correspondiente resistencia en la planta hospedera (como las encontradas para algunas bacterias patógenas Gram-negativo) podrían no existir en el sistema de interacción *Cm*-planta hospedera (Gnanamanickam 2006). A pesar de que esfuerzos de reproducción utilizando especies relacionadas de las plantas hospederas pueden dar origen a variedades que presentan síntomas menos severos, o carecen de síntomas, las especies utilizadas pueden ser susceptibles a las infecciones por *Cm* sin expresar síntomas (Strider 1969, Van Steekelenburg 1985, Laurila *et al.* 2003, Gnanamanickam 2006), y por ende, no pueden ser utilizadas para la producción de semillas. La construcción de variedades realmente inmunes puede ser un reto imposible utilizando los puntos de vista clásicos de reproducción.

Por ello, en el biocontrol de *Cm* se debe emplear un diagnóstico eficiente para prevenir el esparcimiento del patógeno por medio de semillas infectadas u otro tipo de material vegetal contaminado. *Cmm* y *Cms* son organismos de cuarentena bajo la legislación de la Unión Europea de Salud en Plantas (en inglés, European Union Plant Health legislation). Las semillas de tomate y de papa infectadas por *Cmm* y *Cms* correspondientemente, son consideradas como la fuente primaria de epidemias de la enfermedad en estos importantes cultivos (Thyr 1969, Tsiantos 1987, Gnanamanickam 2006).

Los mejores ensayos para detección e identificación de un patógeno es, por supuesto, su aislamiento en medio semi-selectivos o completamente selectivos (Fatmi y Shaad 1988, Gnanamanickam 2006), y la consecutiva prueba de virulencia en la planta hospedera; o prueba de inducción de una reacción hipersensible en plantas no hospederas (Gitaitis 1990, Van Steekelenburg 1985, Gnanamanickam 2006). Sin embargo, dicho procedimiento consume mucho tiempo y no es el adecuado para diagnósticos de alto rendimiento. Por mucho tiempo, ensayos de ELISA (por sus siglas en inglés Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assays) e inmunofluorescencia empleando anticuerpos mono y policlonales fueron ampliamente utilizados, pero no eran muy confiables debido a reacciones cruzadas, ya sea entre las subespecies de *Cm* o con otras bacterias asociadas a plantas (Franken *et al.* 1993, Nemeth *et al.* 1991, De Boer *et al.* 1994, 1984, Gnanamanickam 2006).

La técnica de PCR (por sus siglas en inglés, Polymerase Chain Reaction) utilizando cebadores que generalmente están diseñados en base a la información de secuencias de un patógeno específico, ha sido establecido como método estándar de diagnóstico (Firrao y Locci 1994, Henson y French 1993, Lee *et al.* 1997, Schneider *et al.* 1993, Slack *et al.* 1996, Smith *et al.* 2001, Gnanamanickam 2006). PCR es un procedimiento rápido y sensible que permite identificar la presencia de ADN de un patógeno en una muestra. Dicho procedimiento también puede identificar un patógeno de forma muy específica, dependiendo de la especificidad del par de cebadores a utilizar (Dreier *et al.* 1995,

Gnanamanickam 2006). Un gran número de cebadores han sido descritos en la literatura y algunos han sido recientemente evaluados, pero uno no puede excluir completamente la generación de falsos positivos, en cuyo caso, debe estar seguido al PCR una prueba clásica de virulencia para excluir dichos falsos positivos. Últimamente, los micro ensayos (Microarrays, en inglés) son la forma más nueva de diagnóstico que promete una detección más específica de un patógeno, ya que la presencia de mRNA's (ARN's mensajeros) de varios genes transcritos son simultáneamente analizados (Fessehaie *et al.* 2002, Van Beckhoven *et al.* 2002, Gnanamanickam 2006). Ahora queda determinar si estas técnicas más costosas pueden ser aplicadas y pueden sustituir las técnicas convencionales y clásicas de diagnóstico.

Un problema todavía no resuelto es la epidemiología y estructura poblacional de *Cm* en áreas donde las plantas hospederas están regularmente presentes o de crecimiento exclusivo, es decir, plantaciones dedicadas únicamente a dicha planta hospedera. En estas áreas puede existir una población endémica de varias cepas de *Cm* en el suelo o como epífitas de plantas no hospederas; por el momento no se sabe de estudios de poblaciones naturales de *Cm* (Gnanamanickam 2006). Adicional a un diagnóstico eficiente de *Cm*, el biocontrol también toma en cuenta las medidas de fitosanidad que incluyen el tratamiento de semillas con ácido hidrociorídrico y la solarización de campos e invernaderos para inactivar a *Cm* en el suelo (Antoniou *et al.* 1995, Shlevin *et al.* 2004, Gnanamanickam 2006). También, plantas resistentes a *Cm* han sido inducidas a un pretratamiento con azibenzolar-S-Metilo (Bion) conllevando a una reducción tanto de la severidad de los síntomas como de la cantidad de *Cm* presentes en las plantas (Werener *et al.* 2002, Soyly *et al.* 2003). Otra estrategia emplea bacterias antagonísticas para biocontrol (Gamard y De Boer 1995, Gnanamanickam 2006). Pero un uso general exitoso de este método permanece todavía dudoso, ya que la interacción entre bacterias antagonistas y el patógeno depende de muchos parámetros que incluye el clima, el tipo de suelo, humedad y otros (Gnanamanickam 2006).

Ya que *Cm* no es el tipo patógeno de suelo debido a varias auxotrofías (carencia de una ruta metabólica funcional que genere la sustancia de la que depende el organismo);

puede sobrevivir solamente por un tiempo limitado en el suelo, sin embargo, dicho período también depende del material vegetal en el suelo para que le provea de los nutrientes necesarios para sobrevivir. Por ello, luego de una epidemia de alguna enfermedad derivada de *Cm*, el material vegetal debe ser completamente removido de los campos y quemado. Más aún, por un período de 3 a 5 años, se deben mantener diferentes cultivos en el campo potencialmente contaminados por cepas de *Cm* (Gnanamanickam 2006). La detección microbiológica clásica consume mucho tiempo, y los análisis inmunológicos de *Clavibacter* produce reacciones cruzadas o tiene el problema de tener insuficiente especificidad de los anticuerpos disponibles (Jahr *et al.* 1999). Actualmente están disponibles diversas herramientas y métodos para los análisis moleculares y genéticos de la interacción entre *Cm* con su planta hospedera. Esto es un prerrequisito esencial para continuar con investigaciones en este grupo interesante de bacterias fitopatógenas y relevantes en temas agrícolas. Otro desarrollo importante es la reciente finalización de los proyectos de secuenciación del genoma de *Cmm* y *Cms*, Se espera que la información disponible a partir de los datos del genoma, provea nuevos conocimientos en la relación genética de estas dos subespecies (Gnanamanickam 2006). Solamente cuando se entienda todos los aspectos de la interacción de la bacteria con su hospedero, será posible encontrar formas de generar plantas menos sensibles, e incluso resistentes a la infección con *Cm* y el desarrollo de la enfermedad (Gnanamanickam 2006).

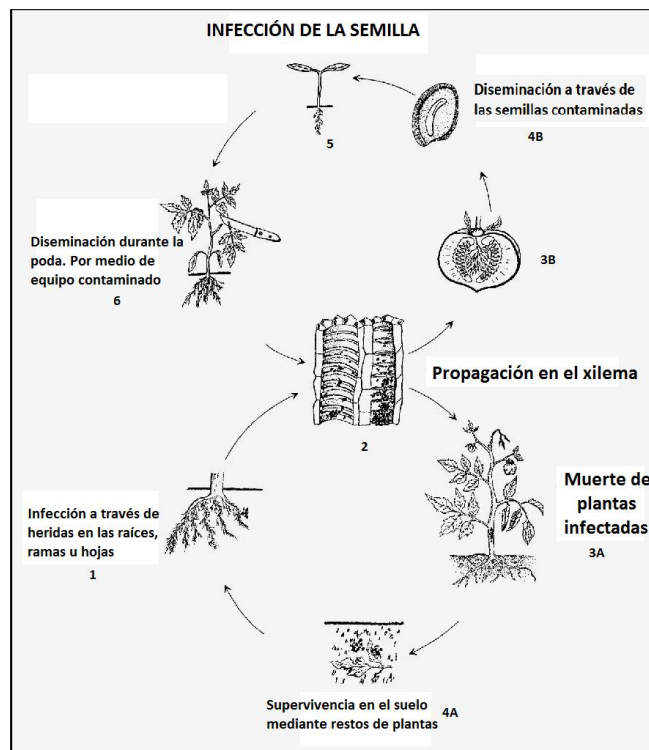
5. SECCIÓN V: *CLAVIBACTER MICHIGANENSIS* SUBSP. *MICHIGANENSIS*: Las bacterias fitopatógenas viven generalmente en la proximidad de las plantas sobre las que son capaces de causar daños y habitualmente no son patógenas del hombre ni de los animales (Gobierno de Aragón 2010). Algunas de las especies causantes de bacteriosis tienen una fase epífita durante la cual viven asociadas a la planta sin causar daños, y cuando se modifican las condiciones climáticas o de cultivo y se dan los factores favorables para el incremento de la población bacteriana, se observan los síntomas de la enfermedad (Ver Figura 6).

Las bacterias fitopatógenas ocasionan un gran número de síntomas que dependen de la bacteria, del tipo de huésped y de su estado fisiológico y fenológico (Gobierno de Aragón 2010). Además, están fuertemente influenciadas por el ambiente, afectando a la multiplicación e inducción de síntomas en las plantas infectadas. En general, los diferentes síntomas pueden agruparse en 6 síndromes: manchas foliares o en frutos; chancros y marchitamiento de plantas leñosas; marchitamiento en plantas herbáceas; hiperplasias y proliferación; roñas o costras; y podredumbres blandas (Gobierno de Aragón 2010).

a. Biología: Las semillas infectadas del tomate dan lugar a plántulas contaminadas. En los lugares donde se han llevado a cabo estudios, no ha ocurrido una transmisión mayor al 1% de las semillas (Eppo 2006). El esparcimiento de la enfermedad en el campo o en invernaderos es favorecido por las prácticas culturales y la presencia de agua, ya sea en forma de lluvia o irrigación (Eppo 2006). A pesar de la ya mencionada forma de ingreso a través de heridas, también se ha reportado ingreso a través de estomas y otras aperturas naturales (Ver Figura 6). Las plantas juveniles son más susceptibles a la enfermedad. Sin embargo, bajo condiciones naturales, las plantas de tomate parecen ser susceptibles durante su ciclo de vida completo (Rat *et al.* 1991; Eppo 2006). Luego de la infección, existe un largo período de latencia antes de la presencia de síntomas. En el xilema, la bacteria causa cavidades y agujeros, así como la presencia de depósitos granulares viscosos y masas bacterianas (Eppo 2006). La bacteria produce glicopéptidos tóxicos que poseen actividad biológica. La bacteria sobrevive durante largo tiempo en la planta, en restos de plantas y equipo o estructuras de cultivo; sin embargo, no es tan longeva en suelo (Eppo 2006, Gnanamanickam 2006). El aislamiento de *Cmm*, puede ser realizado con un medio NGA (Nutrient Glucose Agar) o YPGA (Yeast Peptone Glucose Agar), así como, medios selectivos descritos en la literatura. *Cmm* es una bacteria que posee colonias de lento crecimiento y desarrollo, lisas, brillantes, redondas y amarillas con márgenes enteros. También se han encontrado mutantes de color blanco, rosado, rojo y anaranjado (Bradbury 1986, Eppo 2006).

b. Detección y medios de inspección: Muchos métodos de prueba en semillas han sido últimamente investigados. El uso de medios semi-selectivos para el aislamiento del patógenos a partir de extractos de semilla no son, generalmente, lo suficientemente sensible debido a la presencia de muchos antagonistas en la flora saprófita (Fatmi y Schaad 1988, Shirakawa y Sasaki 1988, Eppo 2006). Los métodos serológicos son suficientemente sensibles pero existen dificultades en obtener suero suficientemente específico. Se han descrito bioensayos que son específicos y sensibles, pero caros y que requieren de mucho tiempo (Van Vaerenbergh y Chauveau 1987, Eppo 2006). Hoy en día se sugiere el uso de métodos moleculares, perfiles de ácidos grasos, perfiles de proteínas e hibridación molecular (Eppo 2006).

Figura 6. El ciclo de vida de *Cmm*. En esta figura se muestra el ciclo de vida conocido para *Cmm*. 1. Se da la infección por medio de heridas o aperturas naturales en raíces, ramas u hojas. 2. La bacteria se esparce por medio de los haces vasculares. Desde este punto, pasan las situaciones A (3A y 4A) y B (3B, 4B, 5 y 6). 3A. La infección puede producir la muerte de la planta. 4B. Luego de la remoción de la planta del campo de cultivo, la bacteria puede sobrevivir en los restos de planta que quedan en el suelo. 3A. Por el contrario, si no se produce la muerte de la planta, la bacteria se dispersa a través de los haces vasculares, llegando al fruto y alojándose tanto en el fruto como en la semilla. 4B. Existe diseminación gracias a la semilla contaminada. 5. La semilla contaminada contribuye directamente con la infección de las plántulas. Finalmente, 6. Se da la diseminación de la bacteria a través de la poda y los injertos. Esto se produce debido a que la bacteria se queda en los instrumentos y equipo, y luego al utilizarlo en otras plantas, o en la misma, se produce la diseminación de la bacteria



(Gnanamanickam 2006).

c. Distribución: *Cmm* fue descrita por primera vez en Norte América y se cree que fue ahí donde se originó. Su distribución es amplia en toda Norte América, Sudamérica, Europa y Oceanía. La distribución en Asia es más restringida pero presente en varios países (Eppo 2006). A pesar de estar entre Norte América y Sudamérica, los reportes de la presencia de esta bacteria en Centroamérica y el Caribe está restringida a Costa Rica, Cuba, Dominica, República Dominicana, Granada, Guadalupe, Panamá y algunos reportes no confirmados indican que está presente en Martinica. Todavía está en estudio la presencia de esta bacteria en Guatemala (Para mayor información ver **6.SECCIÓN VI: MARCHITEZ BACTERIANA DEL TOMATE, g. En Guatemala**)

d. Factores de virulencia y bases moleculares de la patogenicidad:El análisis molecular de la patogenicidad de las bacterias Gram positivo es complicado, ya que las herramientas genéticas y métodos desarrollados bien establecidos para Gram-negativo, no funcionan para Gram-positivo (Jahr *et al.*1999). Los análisis genómicos de *Cmm* mostraron la presencia de al menos cuatro clúster de genes que pueden estar involucrados en la producción de diferentes EPS. Uno de estos clúster incluye todos los genes requeridos para producir los EPS ya caracterizados de *Cmm*. La generación de mutantes en este clúster convirtieron el fenotipo de colonia mucoide en una áspera, concluyendo que había ausencia de EPS y a su vez confirmando que dicho clúster es encargado de la producción de EPS. El papel de los otros tres clúster identificados aún permanece desconocido, sin embargo se tiende a especular que estos tres clúster son requeridos para condiciones especiales, como por ejemplo, reconocimiento del hospedero y evasión de las defensas de la planta (Gnanamanickam 2006).

Los primeros estudios de patogenicidad de *Cmm* involucran el análisis de EPS's. Aunque la bacteria invade los haces vasculares, evitando el transporte de agua, Dreier *et al.* (1997) resaltan que no es el único causante de una marchitez bacteriana sistémica. Por el contrario, los autores mencionan que pueden existir una serie de sustancias que pueden contribuir con la patogenicidad. Un ejemplo de estos compuestos son los EPS (aunque la promueven, no son un factor de crucial de patogenicidad). Otros compuestos relacionados con patogenicidad, mencionados por Dreier *et al.* (1997), incluyen enzimas extracelulares

encargadas de degradar la pared celular (proceso causante de la marchitez); exoenzimas como endocelulasa, poligalacturonasa, pectinmetilesterasa y xilanasa (Dreier *et al.* 1997). En la virulencia de *Cmm* están involucrados dos plásmidos, denominados pCM1 (27.5 kb) y pCM2 (72 kb). Es interesante mencionar que dentro del plásmido pCM1, Meletzus *et al.* (1993) reportaron la presencia de una endonucleasa (codificada por el gen *celA*) así como, la presencia de la región *pat-1* en el plásmido pCM2; sin embargo la virulencia completa solo se observa cuando las cepas de *Cmm* poseen ambos plásmidos (Jahr *et al.* 1999). Los plásmidos como contenedores de genes de patogenicidad parecen ser un caso especial restringido a *Cmm*. El determinante de la patogenicidad contenido dentro pCM1 es la endo- β -1,4-gluconasa, que juega un papel importante en el establecimiento de la marchitez en tomate (Jahr *et al.* 1999); mientras que el factor de virulencia en pCM2 es la región *pat-1*.

1. pCM1 (*celA*): Análisis llevados a cabo por Jahr *et al.* (2000), demostraron que el gen *celA*, que codifica para la endo- β -1,4-gluconasa, está presente en el plásmido pCM1 de *Cmm* y es requerido para el fenotipo patogénico. Este gen posee un marco abierto de lectura (ORF, Open Reading Frame) de 2,238bp y produce un mRNA de aproximadamente 2.4knt (kilonucleótidos). El análisis del sitio inicial de transcripción no reveló suficiente homología para determinar un elemento promotor hipotético (Jahr *et al.* 2000). Varias repeticiones directas y una invertida se pudieron identificar en la región -5' de *celA* y se hipotetiza que podrían tener un papel regulatorio en la expresión génica (Dreier *et al.* 1997). El producto de este gen es una proteína de 78kDa (746 amino ácidos, similar a las endo- β -1,4-gluconasas de la familia A1 de celulasas. *CelA* posee una estructura de tres dominios con un dominio catalítico, un dominio de unión a celulosas del tipo IIa y un dominio C-terminal. Jahr *et al.* (2000) presentaron evidencia de que *celA* tiene un papel principal en patogenicidad, ya que la capacidad de inducción de marchitez es obtenida por la expresión de esta endonucleasa. Sin embargo, todavía se debe estudiar más pCM1 ya que Jahr *et al.* (2000) indican que dicho plásmido puede llevar genes que afectan la colonización o utilización de nutrientes, pero que no están directamente involucrados en los síntomas de marchitez en la planta. A su vez, la hidrólisis de la celulosa requiere un conjunto de enzimas. La primera etapa del ataque enzimático de la celulosa de la planta hospedera es la degradación al azar de enlaces glucosídicos internos en una cadena intacta

de glucanos gracias a las endocelulasas, creando comúnmente una cadena con sitios terminales no reducidos que son susceptibles al ataque de una exocelulasa (Jahr *et al.* 2000). La actividad de *celA* sería suficiente para la patogenicidad, sin embargo, no se conoce que *Cmm* sea una bacteria celulolítica verdadera (Jahr *et al.* 2000)

2. pCM2 (Región *pat-1*):El gen *pat-1* no se encuentra presente en las cepas de *Cmm* de diferente origen geográfico con baja virulencia. Dreier *et al.* (1997) caracterizaron este locus y concluyeron que su presencia, está directamente involucrada con el desarrollo de los síntomas de la enfermedad. Esta región produce una secuencia codificante completa de 3.7kb, cuya expresión es independiente a la orientación (en inglés orientation-independent); sin embargo, se requiere solamente un mínimo de 1.5kb para el desarrollo de los síntomas. *Pat-1* posee un solo ORF, denominado ORF1 (locus de patogenicidad de dicha región), que empieza en ATG180 y termina en TGA1020, produciendo una proteína de 280 aminoácidos y 29.7 kdal. Existe un péptido-sígnal en ORF1, indicando que posiblemente este ORF es secretado por medio de una ruta SEC-dependiente. ORF1 presenta homologías significativas a las serin-proteasas de *Lysobacter enzymogenes*, *Streptomyces griseus* y a varias especies de *Staphylococcus*, presentando motivos consenso de la familia tripsina de las serin-proteasas que poseen serina en el sitio activo, sin embargo, carecen de histidina (característica clásica de la familia serin-proteasas).

ORF1 posee veinte repeticiones directas en tándem que consisten de siete u ocho pares de bases (llamadas *pat-1rep*) precedidas de 14 residuos de guanósina, una repetición invertida (denominada IR4) que puede funcionar como un terminador transcripcional del tipo Rho-independiente y se encuentra cerca de la región *pat-1 rep*. ORF1 produce un transcrito único que migra como molécula de ARN de aproximadamente 1500nt, transcrito que Dreier *et al.* (1997) no observaron en cepas sin plásmido. A pesar de poseer varias copias de *pat-1*, incluso en diferentes orientaciones, la transcripción ocurre desde el promotor *pat-1* nativo. La transcripción ocurre a 97 nucleótidos del codón de inicio en ORF1. Existen cuatro repeticiones de secuencia (denominadas de DR1 a DR4) en la región del promotor que pueden servir como señales regulatorias. La terminación ocurre “downstream” (seguido a una secuencia dada) de la secuencia repetitiva *pat-1rep*. El 3’

terminal del mRNA de *pat-1* puede formar un doblez altamente estable que consiste en una estructura en forma de horquilla y un terminador similar de tipo a terminadores Rho-independiente. La horquilla del mRNA de *pat-1* estabiliza el mRNA contra la degradación de RNasa II y la fosforilasa polinucleotídica (Polinucleotide-Phosphorilase), las dos principales nucleasas involucradas en la degradación del mRNA; degradando ARN de simple hebra desde su extremo -3', lo que no pasa con el mRNA de *pat-1*. Solamente las cepas de *Cmm* virulentas poseen motivos de ADN (*en inglés* DNA motifs) homólogos a *pat-1*, mientras que en cepas no virulentas, esto no ha sido detectado (Dreier *et al.* 1995).

En cuanto a *pat1-rep*, se ha observado que posee un alto nivel de conservación entre las cepas de *Cmm*, poseyendo todas, un motivo poli-G (consta de 8 a 14 guaninas) que está seguida de varias repeticiones directas (DR2) y una repetición invertida (IR4) (Dreier *et al.* 1995). Estas regiones producen un ARN de doble hebra termodinámicamente estable, con una estructura en forma de horquilla en el 3'terminal formado por la región IR. Una delección de *pat1-rep* resulta en la reducción de virulencia (Dreier *et al.* 1995). Dreier *et al.* (1997) concluyen que el locus *pat-1* en *Cmm* es responsable del fenotipo virulento mediado por el plásmido pCM2. La región es de 1.5kb con ORF1 y *Pat1-rep*, que son indispensables para la inducción de marchitez en tomate. Comparaciones del promotor *pat-1* con otros promotores ricos en G's y C's de bacterias Gram-positivo, indican que no hay suficientes homologías como para definir un promotor consenso para *Clavibacter*. En la transcripción de *pat-1* se encontró repeticiones directas de 6 a 8 nucleótidos presentes en ambos lados del sitio de inicio, lo que puede representar sitios de unión para proteínas regulatorias específicas que modulan la expresión del gen *pat-1*. La traducción de ORF1 es requerida y el producto del gen es un determinante en la patogenicidad de pCM2. Dentro de los productos que muchos patógenos de plantas secretan, se incluyen importantes factores de virulencia como productos extracelulares (enzimas que degradan pared celular de las células de la planta), toxinas, ADN, hormonas y moléculas señalizadoras. De éstas, para bacterias patógenas se ha discutido que son más importantes las celulasas, pectinasas y proteasas. *Cmm* presenta homologías significativas con serin-proteasas. Estas regiones homólogas son parte del sitio catalítico, y por ello, funcionalmente importantes. El rol de las proteasas bacterianas puede ser simplemente de nutrición, aunque es posible que la

proteólisis de las proteínas estructurales en las paredes celulares de plantas sea requerida para permitir que la bacteria se disperse y supere las reacciones de defensa del hospedero (Dreir *et al.* 1997). En la interacción *Cmm*-planta los síntomas de marchitez aparecen en una etapa tardía de infección, por lo que la expresión de ORF1 podría estar regulada por factores propios de la planta. La ausencia de *pat1-rep* logra una reducción en la virulencia, atrasando los síntomas de marchitez y evitando una mayor reducción en biomasa de la planta. El mRNA de *pat-1* tiene un dobléz que forma ARN de doble hebra, posiblemente para protegerlo de degradación por endo-ribonucleasas celulares. De ser esto cierto, la delección de *pat1-rep* puede resultar en menor cantidad del producto del gen *pat-1* y virulencia reducida (Dreir *et al.* 1997). Las repeticiones invertidas al final de *pat1-rep* (IR4) forman una estructura en forma de horquilla, altamente estable y puede representar la señal de terminación de la transcripción. *Pat1-rep* presenta un alto grado de conservación estructural y al estar presente en los plásmidos, es inevitable observar una correlación entre la pérdida de plásmidos y la reducción de virulencia. En conclusión, hay fuertes evidencias de que la presencia de genes involucrados en la inducción de la marchitez en *Cmm* está presente en los plásmidos (Dreir *et al.* 1997).

3. EPS/Enzimas: *Cmm* produce exopolisacáridos (EPS) que generan una matriz saturada de agua alrededor de la bacteria. Esta matriz la protege de desecación y deshidratación. Los EPS son principalmente acídicos y pueden actuar como intercambiadores de iones, concentrando minerales y nutrientes, así como, actuar como uniones a compuestos tóxicos (Jahr *et al.* 1999). Los EPS pueden prevenir el reconocimiento del patógeno por las defensas de la planta, bloquear aglutininas o lectinas y, detoxificar de compuestos como fitoalexinas u oxígeno reactivo. Los EPS pueden mediar la adherencia a superficies biológicas y abióticas y, puede también promover la infección y colonización de la planta hospedera, requerimiento indispensable para el desarrollo de la enfermedad (Jahr *et al.* 1999). Los EPS pueden causar estrés severo de deshidratación en las plantas, facilitado por las altas concentraciones de la bacteria en haces vasculares y la capa viscosa formada alrededor de la bacteria. La colonización sistémica de la planta, en conjunto con la producción de EPS parece representar suficiente explicación del por qué de la marchitez en plantas infectadas con *Cmm* (Jahr *et al.* 1999). Sin embargo, puede que los

EPS no sean un factor crucial en la patogenicidad de *Cmm*. Variaciones en los azúcares de los EPS están correlacionados a la inhabilidad de colonizar plantas de tomate, lo que indica que la estructura química de los EPS puede tener un rol importante en el reconocimiento del hospedero y las etapas tempranas de la infección (Jahr *et al.* 1999).

Las enzimas extracelulares secretadas por la bacteria también pueden contribuir al desarrollo de los síntomas de marchitez en plantas infectadas. Esto se debe a que las enzimas pueden atacar haces vasculares y células del parénquima adyacentes (Jahr *et al.* 1999). En la mayoría de cepas de *Cmm*, el gen de endonucleasa está presente en uno de los plásmidos nativos, y de acuerdo con Jahr y colaboradores (1999), las celulasas son un factor importante de patogenicidad. En algunas interacciones de tipo NO (óxido nítrico)-Huésped o resistencia innata en plantas, las bacterias producen una reacción hipersensible caracterizada por ser una respuesta rápida, produciendo una muerte localizada y rápida de las células de la planta en el sitio de infección (Jahr *et al.* 1999) *Cmm* puede causar una reacción hipersensible en plantas no hospederas, principalmente la planta modelo de estudio llamada “4 O’clock” (*Mirabilis jalapa*) (Jahr *et al.* 1999).

e. Control: Para la prevención de epidemias de infecciones de *Cmm* en invernaderos, el uso de lizozima ha dado resultados prometedores (Utkhede y Koch 2004, Gnanamanickam 2006), mientras que estreptomycin, hidróxido de cobre y Mancozeb (fungicida de amplio rango de acción) no han tenido efectos en la protección de los tomates en contra de esta bacteria (Hausbeck *et al.* 2000). El control químico de la enfermedad por medio de antibióticos o compuestos de cobre no son muy efectivos y, representan una serie de severos problemas para el medio ambiente. Esfuerzos para proveer cultivos de plantas resistentes tampoco han sido exitosas (Jahr *et al.* 1999). La prevención de la enfermedad es solamente posible mediante el uso de semilla certificada o transplantes que han sido examinados y resultaron negativos a *Cmm*. Actualmente existen técnicas altamente sensibles y específicas para el monitoreo de esta enfermedad, sin embargo, todavía queda mucho más por estudiar y conocer para desarrollar técnicas baratas, confiables y rápidas, no solo de detección, sino de control y terapia (Jahr *et al.* 1999).

6. SECCIÓN VI: MARCHITEZ BACTERIANA DEL TOMATE: Patógenos vegetales de origen bacteriano y fúngico (hongos) son responsables por serias pérdidas económicas, especialmente en condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad (Gnanamanickam 2006). A pesar de que las enfermedades de origen fúngico forman la mayor parte de enfermedades de prevalencia y alta pérdida de plantas de producción, también existe un número significativo de enfermedades de origen bacteriano que están consideradas como extremadamente destructivas, por lo tanto constituyen una amenaza a los cultivos a través del mundo (Gnanamanickam 2006).

a. Generalidades: La marchitez bacteriana del tomate es una enfermedad potencialmente seria que ocurre en plantaciones comerciales y jardines hogareños (Seebold 2008). Esta enfermedad infecciosa es capaz de esparcirse rápidamente, resultando en pérdidas devastadoras. Es particularmente difícil controlar esta enfermedad ya que, no solamente no existe alguna cura, sino que el patógeno puede ser difícil de erradicar media vez se haya introducido en el invernadero, el jardín o el campo de cultivo (Seebold 2008). Aunque relativamente esporádico en incidencia, es de naturaleza tan destructiva que debe practicarse vigilancia en la selección y manejo de patrones de semilla, preparación y manejo de sustratos en invernadero, y selección y preparación del suelo para producción en campo abierto (Productores de Hortalizas 2006). Es una enfermedad vascular (sistémica) y superficial con una amplia gama de síntomas que resultan en pérdida del área fotosintética, marchitez y muerte prematura, así como producción de frutos no comerciables. El organismo se transmite por la semilla y puede sobrevivir durante periodos cortos en suelo, estructura del invernadero y equipos, y por periodos más largos en residuos vegetales (Productores de Hortalizas 2006)

b. Síntomas: Las plantas son vulnerables en cualquier etapa de desarrollo. Las plántulas infectadas se mueren rápidamente o producen plantas débiles (Productores de Hortalizas 2006, Seebold 2008). Si las condiciones para el desarrollo de la enfermedad no son favorables las plántulas pueden generar plantas aparentemente sanas hasta que se trasladan al campo. Los primeros síntomas de la enfermedad son marchitez, rizado y bronceado de las hojas, a menudo en un solo lado de la planta. La marchitez también es

evidente en los campos de cultivos y, generalmente, son los primeros síntomas de la enfermedad en ser observados (Ver Figura 7A, 7B, 7C y 7D). Los tallos se dividen, resultando en chancros abiertos, lo que le da el nombre en inglés a esta enfermedad (Ver Figura 7E). Si se practica un corte en el tallo puede observarse decoloración café en el elemento vascular. Avanzada la enfermedad, se pueden producir llagas en el fruto (Ver Figura 8A y 7B) (Seebold 2008). Los síntomas se dividen en: superficiales (por colonización bacteriana de tejidos superficiales, y sistémicos (por invasión bacteriana del tejido vascular). Aparecen lesiones necróticas de hasta 6 mm de diámetro en la superficie de las hojas viejas superiores, o puntos circulares ligeramente protuberantes de 3 mm de diámetro. Pueden observarse manchas similares en tallos y pecíolos (Productores de Hortalizas 2006).

c. Dispersión: Las semillas son el principal vector a larga distancia del patógeno. El intercambio de semillas ha facilitado la distribución mundial de la enfermedad. Localmente, en invernaderos y campos de cultivo, el equipo contaminado puede permitir la transmisión de la enfermedad de un invernadero, campo de cultivo o granja, a otros (Eppo 2006).

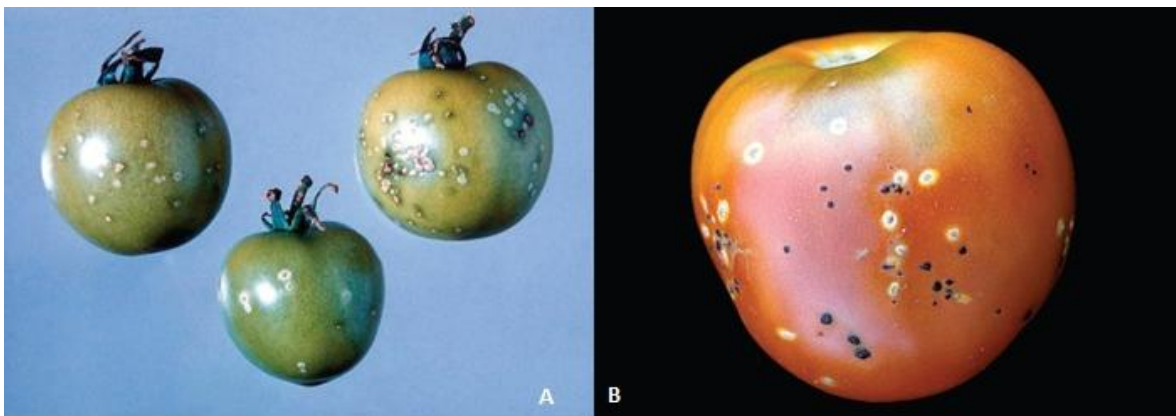
d. Impacto económico de la enfermedad: Desde el primer reporte de la enfermedad en Estados Unidos en el año de 1910, *Cmm* se ha esparcido alrededor del mundo y ha causado serias pérdidas tanto en invernaderos como en campos de cultivo (Eppo 2006). Las pérdidas se dan debido a la muerte de plantas juveniles o a la desfiguración del fruto. Por ejemplo, en el Norte de Carolina, Estados Unidos, se ha reportado la reducción del 70% del las plantas del campo de cultivo, mientras que en Francia ha sido del 20 al 30% (Eppo 2006). De acuerdo con Dreier *et al.* (1997), ha habido años en los que la pérdida mundial de la producción comercial del tomate ha sido de hasta el 60%. Finalmente, una contra muy importante es la carencia de cultivares de tomate resistentes y la falta de controles químicos contra este patógeno que sean efectivos (Dreier *et al.* 1997)

Figura 7. Síntomas de marchitez bacteriana en plantas de tomate. A. En esta figura se puede observar la etapa temprana de marchitez causada por *Cmm* en plantas de tomate jóvenes, síntomas principalmente en hojas y tallos (Seebold 2008). B y C. Aquí se observa la necrosis marginal de las hojas, en donde se observan partes café debido a muerte celular. Adicionalmente, en B, se observa la fase avanzada de la enfermedad, en donde el fruto (tomate) presenta una grave necrosis (Seebold 2008). D. En esta figura se puede observar el corte transversal del tallo de una planta sana (superior), en comparación con una planta enferma (inferior). La planta enferma no solo presenta una disminución en diámetro de los haces vasculares, sino presenta necrosis y agregado bacteriano en forma de mucosa blanca (Asta 2009). E. Necrosis en tallo de planta adulta de tomate enferma. Se observa cómo éste se debilita, posiblemente a la presencia de enzimas degradantes, saturación de bacteria y estrés por falta de agua, todas causadas por *Cmm*.



(Seebold 2008).

Figura 8. Marchitez bacteriana del tomate en frutos. A. Marchitez bacteriana en tomate verde, se puede observar las típicas aureolas entre amarillo a blanco denominado “El síntoma del ojo de Ave,” ó en inglés “Bird’s eye symptom”. B. Marchitez bacteriana en tomate rojo, que presenta manchas de color café rodeadas por una aureola blanca causada por *Cmm*. Las manchas de café oscuro, sin la aureola blanca alrededor, pueden ser causadas por diferentes patógenos bacterianos, como *Pseudomonas syringae*.



(Asta 2009)

e. Manejo y control: Se debe utilizar semilla certificada, sana, o procedente de plantas sanas y trasplantes sanos que hayan sido sometidos a un estricto proceso de inspección, ya que no es posible distinguir las plántulas sanas de las infectadas al momento del trasplante (Productores de Hortalizas 2006). En invernadero, detener polinización y fumigación de alta presión para reducir el ritmo de propagación; retirar plantas infectadas y aledañas mediante el corte a ras de suelo; desinfectar ropa y calzado, herramientas y cables de sujeción con compuestos de amonio como los que se utilizan para el almacenamiento de papas (Productores de Hortalizas 2006). En el campo, si se detecta la enfermedad a principios de temporada, deben ararse los suelos en zanja para prevenir propagación a campos aledaños y retirar las plantas infectadas (Productores de Hortalizas 2006). Deben esterilizarse las camas y suelos en invernadero para destruir la bacteria mediante vapor caliente o fumigante de suelo. En el campo deben enterrarse los residuos vegetales; rotar el cultivo durante al menos tres años, y eliminar malezas de la familia de las solanáceas. La aplicación de cobre puede ayudar a proteger las plantas sanas, sobre todo si solo existen síntomas superficiales (Productores de Hortalizas 2006).

f. Riesgo fitosanitario y medidas fitosanitarias: EPPO (1982) ha listado a *Cmm* como una peste de cuarentena tipo A2 (A2 significa que la peste está presente en las regiones EPPO), mientras que la Caribbean Plant Protection Commission (CPPC) y la Inter-African Phytosanitary Council (IAPSC) también la consideran como una peste de cuarentena. *Cmm* causa una de las enfermedades más serias en el tomate, que puede ser contralada con medidas de fitosanidad (Eppo 2006), mencionadas con anterioridad en la sección de manejo y control de la Marchitez Bacteriana del Tomate.

g. En Guatemala: En cuanto a la parte legal, la Oficina de Normas y procedimientos (ONP), Unidad de Normas y Regulaciones del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA) redacta el Acuerdo Ministerial No. 813-2007 con fecha de publicación diario oficial del 17 de enero del 2008 y con fecha de entrada de vigencia para el 29 de enero del 2008 (MAGA 2008). El objetivo del acuerdo posee como asunto la aprobación del listado de plagas cuarentenarias para la Importación de Granos y Harinas de Norte América (Estados Unidos, Canadá y México) con fines de industrialización. Este es

el único acuerdo encontrado en el que se menciona el género *Clavibacter* (específicamente *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* y *C. michiganensis* subsp. *tessellarius*) como plaga cuarentenaria en Guatemala. Sin embargo, probablemente a que este acuerdo solo menciona plagas para granos y harinas o a que para el 2008 todavía no se había reportado en Guatemala, se excluye *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

De acuerdo a la Asociación Nacional de Productores de Invernadero (ANAPI), *Cmm* fue detectada por primera vez en Guatemala para octubre del año 2009 (Bolaños 2010a). Para principios de septiembre del 2010, Bolaños (2010a) menciona que *Cmm* había dañado y retrasado dos meses la producción nacional de tomate en invernadero que sería exportado a Estados Unidos. Debido a la enfermedad, los productores se vieron obligados a desechar 400,000 plántulas o pilones que estaban contaminados. De acuerdo con la declaración de ANAPI publicada en Bolaños (2010a), los daños alcanzarían los Q4 millones de Quetzales, añadiendo que el retraso en las ventas podría haber representado hasta los Q15 millones en pérdidas. Dichas pérdidas no eran solo monetarias, sino también que los productores pudieron haber perdido la mayor ventana de oportunidad para vender a los Estados Unidos en noviembre del 2010, ya que en ventas a dicho país se estimaban en 15 millones de Dólares Estadounidenses (USD), aproximadamente Q120 millones. Durante el 2010, la siembra de tomate en invernadero, normalmente iniciada en agosto, tendría lugar en octubre debido a que los productores tuvieron que eliminar las plantaciones contaminadas (Bolaños 2010A). ANAPI informó que análisis de diferentes laboratorios determinaron que la mayoría de casos de infección están asociados a plantas injertadas, utilizando como patrón la semilla de tomate Maxifort de la empresa Monsanto, alertando sobre el uso de estas semillas.

A pesar de ello, los productores y proveedores de la semilla difieren al respecto del origen de *Cmm* en tomate y las razones de la enfermedad (Bolaños 2010b, 2010c). El MAGA, para el 21 de septiembre del 2010, indicaba que realizaría inspección, muestreo y diagnóstico fitosanitario en las áreas afectadas por *Cmm* para confirmar o descartar la existencia de dicha bacteria y su origen en plantaciones locales agregando que se fortalecerían las medidas cuarentenarias para autorizar o no la importación de semillas

provenientes de países donde se ha reportado la presencia de la bacteria (Bolaños 2010b, 2010c). A pesar de que los productores afirman que la contaminación proviene de las semillas de Monsanto, esta transnacional indicó que aplican rigurosas pruebas en el proceso de certificación de sus embriones, añadiendo que a Maxifort se le han aplicado pruebas y que estas han dado resultados negativos para la presencia de *Cmm*. La empresa mencionó que un foco donde se puede dar este tipo de enfermedad es en el proceso en el que se lleva a cabo el injerto de la planta, ya que ésta se puede contagiar por medio de los instrumentos y agua utilizado, así como, por medio del personal (Bolaños 2010b, 2010c). Ante ello, Monsanto descartó responsabilidades y dijo que no indemnizarían a los productores. ANAPI explicó que esa posibilidad se analizó y se descartó ya que varios invernaderos con pilones de dos compañías distintas tuvieran problemas, y que se detectó que ambas piloneras usaron la misma semilla (Bolaños 2010b). Los invernaderos afectados se encuentran en San Raymundo, Casillas, Santa Rosa de Lima y Mataquescuintla, Jalapa (Álvarez 2011).

ANAPI busca indemnización por Q25 millones a los agricultores que adquirieron dichas semillas, debido a pérdidas causadas durante la producción 2009-2010 debido a muerte de cultivos, gasto en desecho de equipo (muchas veces nuevos) y descontaminación de los invernaderos (Maldonado 2011a). Las semillas infectadas dañaron a 15 de los 18 exportadores de tomate del país, causándoles pérdidas superiores a los USD 3 millones, afectando toda la cadena de producción y comercialización (Anónimo 2011b). El MAGA luego de recibir las pruebas de los laboratorios que analizaron las muestras otorgadas por ANAPI, menciona que las pruebas no son concluyentes (Bolaños 2011a) y que los laboratorios no poseen la tecnología para determinar el origen de la contaminación, aunque se haya determinado la presencia de *Cmm* (Anónimo 2011a). ANAPI, pidió que el MAGA revisara y examinara el tema de licencias fitosanitarias para evitar que ingresen más semillas contaminadas al país, y que a su vez, se pueda llegar a una conciliación (Álvarez 2011). Por su parte, la cámara del Agro, expuso que este problema lo único que refleja es la debilidad institucional que hay en el MAGA, ya que como institución encargada debe identificar las fallas que hubo en los lotes de semillas que se comercializaron. Agregó que era preocupante la información que proveen los productos importados (Maldonado 2011b).

Esto fue mencionado ya que el MAGA (Bolaños 2011b) mencionó que no existe trazabilidad (control de lotes de semillas usadas en siembras) reconocida legalmente y que los productores tampoco brindaron las facturas que amparen la compra. Otro problema subyace en el hecho de que los formularios en los que se autorizan las importaciones, no se especifican los números de lotes de las semillas (Bolaños 2011b).

Para el 14 de febrero del 2011, la Unión Europea (UE) por medio del proyecto FOGUAMI, equipará los laboratorios del MAGA de alta tecnología y con los cuales se podrá certificar los productos de pequeños y medianos exportadores dedicados a comercializar sus productos en mercados europeos (Maldonado 2011c). Posteriormente, para el 09 de marzo del 2011, ANAPI preparaba una demanda internacional contra Monsanto en tribunales de estados Unidos, debido a la semilla contaminada que dañó los cultivos de tomate. Sin embargo, de momento ANAPI evitará hacer la demanda en el marco del Tratado de Libre Comercio con Estados Unidos, ya que para eso necesitarían el apoyo del Estado de Guatemala, el cual no lo poseen (Anónimo 2011). Finalmente, Ortiz (2011) indica que los resultados de dos análisis de laboratorios del MAGA y de la Universidad del Valle de Guatemala (UVG) confirmaron positiva la presencia de *Cmm* en un lote de semilla Maxifort F1 que fue importado en junio del 2011 desde Holanda por Sanidad y Nutrición Animal Centroamericana, S.A. (Sanucasa), quien es el distribuidor de Monsanto en Guatemala. Según Ortiz (2011), el MAGA autorizó la venta del lote de semillas previamente a conocer los resultados de laboratorio e indica que: “un oficio enviado por el MAGA a ANAPI indicando que la muestra de las semillas fue obtenida el 3 de junio del 2011 y 10 días después se confirmó la presencia de *Cmm*, misma bacteria que fue encontrada por el laboratorio de la UVG el 3 de noviembre del 2011”.

B. JUSTIFICACIÓN

Dentro de las bacterias fitopatógenas más importantes, está un pequeño grupo de bacterias Gram-positivo, siendo *Clavibacter* uno de los géneros que tiene más importancia en el campo agricultura. Este género está poco estudiado y produce enfermedades graves en plantas. La marchitez bacteriana del tomate, causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, es una de las principales y más graves enfermedades del tomate (Eppo 2006, Gnanamanickam 2006, Seebold 2008). Esta enfermedad produce pérdidas de millones de dólares estadounidenses a nivel mundial, y recientemente de millones de Quetzales a nivel nacional (Bolaños 2010a, Bolaños 2010b, Bolaños 2010c, Álvarez 2011, Maldonado 2011a). Los antibióticos no son efectivos en contra de esta bacteria, así como, tampoco existen variedades de tomate resistentes (Jahr *et al.* 1999). La infección por esta bacteria representa la muerte del cultivo (en caso de que la sintomatología se presente grave) o la remoción del cultivo (en caso de ser detectado en etapas tempranas), la remoción del suelo y uso de la parcela para otro tipo de cultivo; incluso se debe eliminar cualquier material y equipo que haya entrado en contacto con la bacteria (Dreier *et al.* 1997, Jahr *et al.* 1999, Hausbeck *et al.* 2000, Utkhede y Koch 2004, Gnanamanickam 2006, Eppo 2006). Recién en octubre del 2009 ha sido reportada por primera vez la presencia de esta bacteria en cultivos de tomate de invernadero en Guatemala (Bolaños 2010a), es por eso que un método de identificación riguroso, confiable y reproducible debe ser implementado.

Las técnicas de microbiología convencional para la identificación de la bacteria no son lo suficientemente específicas como para determinar la subespecie analizada, ya que todas las subespecies de *C. michiganensis* están altamente relacionadas, poseyendo características físicas, morfológicas y moleculares casi idénticas. Las técnicas moleculares actuales están ampliamente desarrolladas para bacterias Gram negativo, pero las mismas no funcionan bien para bacterias Gram positivo. Tomando en cuenta que *Cmm* es una bacteria cuarentenada, no debe haber vacíos en cuanto a los procedimientos de identificación. Es por ello que la determinación e implementación de una serie de técnicas microbiológicas y moleculares, que integradas posean una mayor rigurosidad en el aislamiento, identificación y caracterización de bacterias patógenas Gram-positivo, es indispensable; siendo ésta, la

principal importancia de este trabajo. Adicionalmente, debido a la delicadeza del tema, es necesario que la rigurosidad previamente mencionada, también involucre un confiable con el cual distinguir bacterias Gram-positivo de las bacterias Gram-negativo encontradas naturalmente en el suelo, ya que puede llevar a falsos resultados. Este trabajo, adicionalmente a buscar un método capaz de aislar e identificar Gram-positivo, busca hacerlo de manera fácil, rápida y eficiente para ponerlo al servicio de los agricultores que se dedican al cultivo de tomate en Guatemala.

C. OBJETIVOS

1. General: Aislar bacterias Gram-positiva a partir de tejido vegetal de tomate e identificarlas mediante técnicas microbiológicas clásicas y técnicas moleculares.

2. Específicos:

- Aislar bacterias Gram-positivo a partir de tejido vegetal utilizando medios de cultivo convencionales, con énfasis en *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.
- Realizar una descripción física y morfológica de las colonias de bacterias Gram-positivo previamente aisladas.
- Determinar el Gram de las colonias aisladas utilizando la tinción del mismo nombre.
- Identificar molecularmente las bacterias aisladas analizando la región ARNr 16S.
- Determinar la presencia o ausencia de los plásmidos de virulencia pCM1 y pCM2 asociados a *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* en las colonias de bacterias Gram-positivo aisladas.

D. HIPÓTESIS

Ho. Ninguna bacteria aislada de tejidos de tomate es *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Ha. Al menos una bacteria aislada de tejidos de tomate es *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

II. METODOLOGÍA

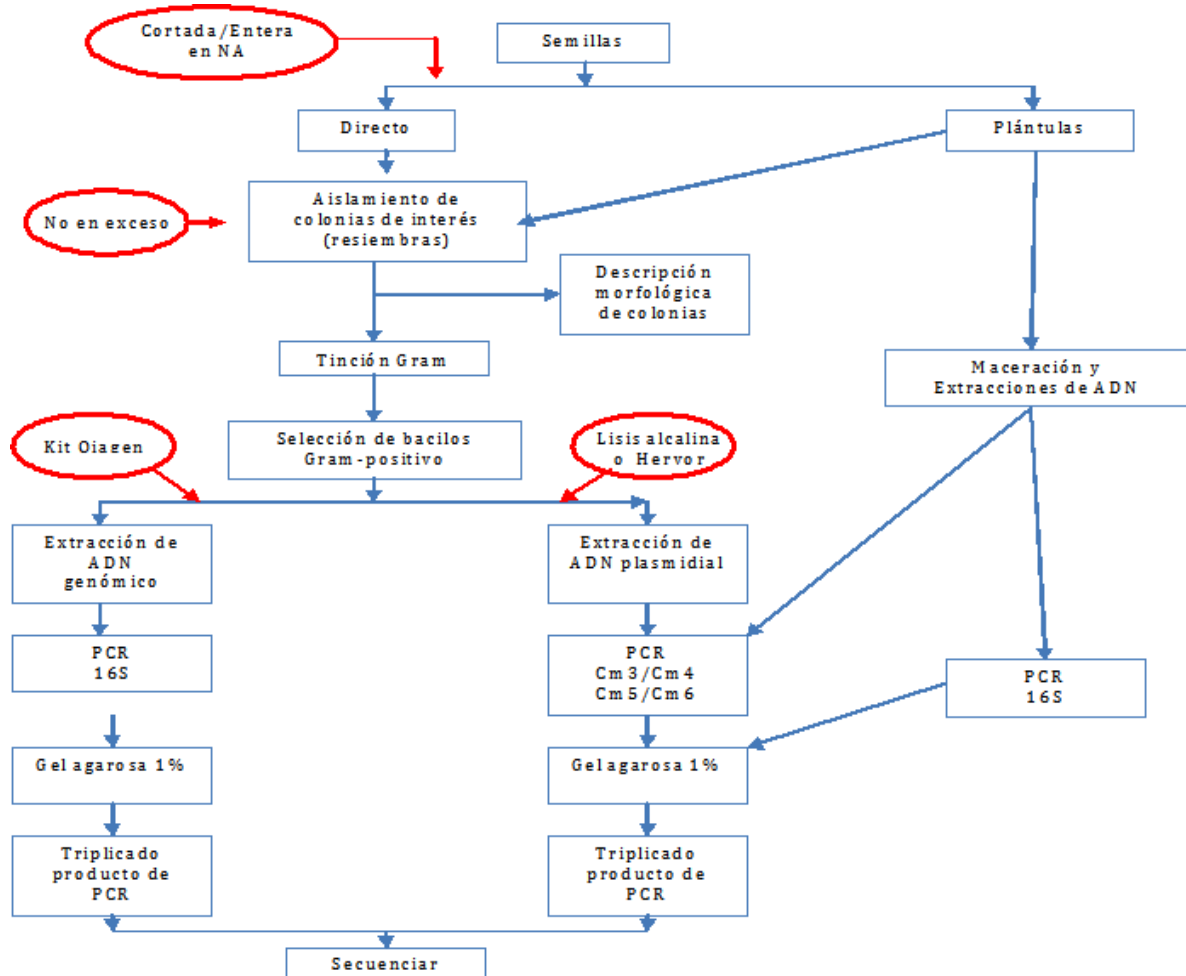
Este trabajo contó con dos componentes principales: Una parte microbiológica y una parte molecular.

La parte microbiológica abarcó la primera fase e incluía la obtención de bacterias a partir de semillas de tomate (previamente desinfectada con baño de cloro 10% y etanol 70%). Se utilizó tanto semilla entera como semilla cortada a la mitad y luego dejada en placa de Petri con Agar Nutritivo (NA) para promover el crecimiento de bacterias que estén vinculadas a dichas semillas. También se obtuvieron plántulas en el laboratorio mediante la germinación de las semillas del mismo lote. Las muestras de plántulas fueron maceradas en agua destilada estéril. A partir de esta solución, se tomó una muestra con una asa de Henle para sembrar el macerado en medio NA en cajas de Petri. Todo el trabajo fue realizado en condiciones asépticas.

A partir de las muestras de bacterias obtenidas ya sea de las semillas enteras o cortadas, o del macerado, se procedió a la selección de colonias bacterianas con morfologías descritas para *Cmm* (colonias en forma de domo, lustrosas, con bordes definidos y con colores entre amarillo claro y amarillo verdoso). Las bacterias seleccionadas como positivas para morfología *Cmm* fueron “resembradas” en NA y se esperó a que creciera un número adecuado de colonias. Se identificó la morfología bacteriana (bacilos, cocos o espirilos) y se llevó a cabo una tinción de Gram para determinar si eran Gram-positivo o Gram-negativo. Posteriormente, se procedió a la extracción de ADN utilizando diferentes métodos de extracción directamente de las colonias aisladas. Una vez obtenido el ADN, se realizó una amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, Polimerase Chain Reaction) dirigido regiones en los plásmidos pCM1 y pCM2, así como a la región 16S ARNr. Una falta de amplificación en pCM1 y/o pCM2 fue tomada como negativo para *Cmm*, sin embargo, todas las muestras fueron conservadas y el producto de amplificación de la región 16S ARNr fue enviado a secuenciar para poder llevar a cabo una

identificación de las colonias mediante el método BLASTn en el sitio de NCBI utilizando bioinformática. La Figura 9 describe de forma ilustrada el proceso que se siguió durante este trabajo.

Figura 9. Diagrama de flujo de la metodología a seguir durante este trabajo. En este diagrama se muestra la metodología seguida en este estudio de una forma en gráfica y resumida para facilitar su comprensión. Empezando desde el ingreso de la muestra, en este caso semillas, hasta sus posteriores análisis microbiológicos y moleculares

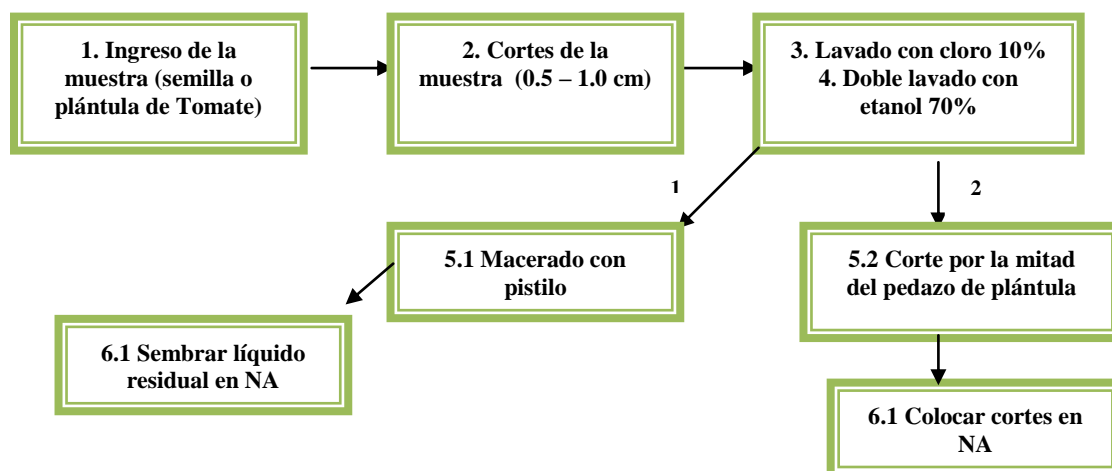


A. PROTOCOLOS

a. Aislamiento bacteriano. Se realizaron cortes en la muestra de planta de tomate (especialmente tallo de la plántula o semilla), de aproximadamente 0.5 a 1 cm. Estas muestras se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5mL. Se lavó las muestras con solución de

cloro al 10%, se descartó el cloro dejando las muestras dentro de los tubos. Posteriormente se realizó un doble lavado de las muestras con etanol al 70%. Finalmente las muestras se lavaron dos veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de etanol. Para la siembra de bacterias se realizaron dos procedimientos para una misma muestra. En el primer procedimiento, las muestras se maceraron con un pistilo dentro del micro tubo, de tal forma que los líquidos de la plántula se mezclen con el agua. En el segundo procedimiento, se extrajo un pedazo de plántula, el que se cortó a la mitad (sin regresarse al micro tubo). Las muestras del primer procedimiento, con un asa de Henle que se introduce dentro del micro tubo, se siembra en el medio de Agar Nutritivo (NA) en una placa de Petri. Para el segundo procedimiento, el pedazo de plántula cortada, se colocó de tal forma que el área donde se realizó el corte quedara en contacto con el NA dentro de una caja de Petri. Se esperó de 2 a 4 días, luego se revisó el crecimiento bacteriano. Las colonias buscadas eran de un color entre amarillo y verde, y la colonia debía poseer forma de domo sin ningún olor extraño, sino ya esto indicaba que dicha colonia era de una especie diferente (ej. *Pseudomona*). Todo el tiempo se trabajó en la campana de flujo laminar y con el mechero encendido. Se evitó cualquier tipo de contaminación indeseada, y se puso principal cuidado en el manejo de materiales, muestras y en el rotulado de las mismas.

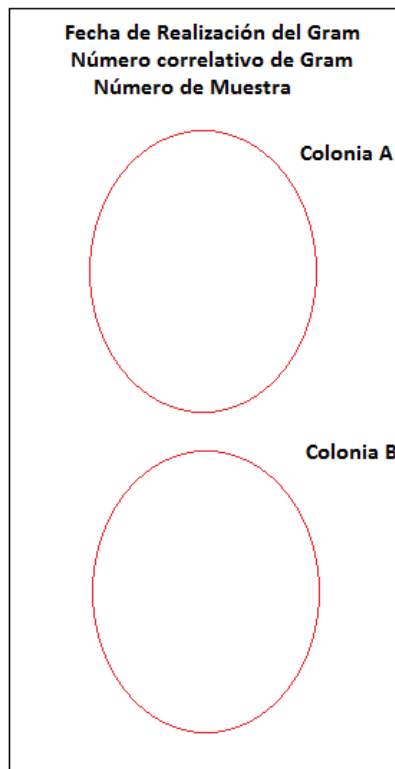
Diagrama 1. Obtención de Colonias: Este diagrama ilustra el procesamiento de muestras para obtener colonias bacterianas a partir de tejido de tomate.



1. Aislamiento de la bacteria a partir de la siembra en agar. Una vez que crecidas en NA las colonias con las características deseadas, se tomó una pequeña muestra de dicha colonia con el asa de Henle ó con un asa de punta y resembrarla en nueva caja de Petri en medio NA. Esto se repitió hasta que crezca la bacteria con las características deseadas.

2. Preparación de la bacteria para determinación del tipo de Gram de la misma. Se rotuló debidamente los portaobjetos a trabajar. Se realizó dos tinciones Gram por portaobjetos. El rotulado incluyó la fecha y el número de tinción a realizar, el número de muestra y un óvalo vacío (donde se trabajó la muestra). La Figura 10 muestra cómo se llevó a cabo la rotulación en un portaobjetos para la tinción de Gram.

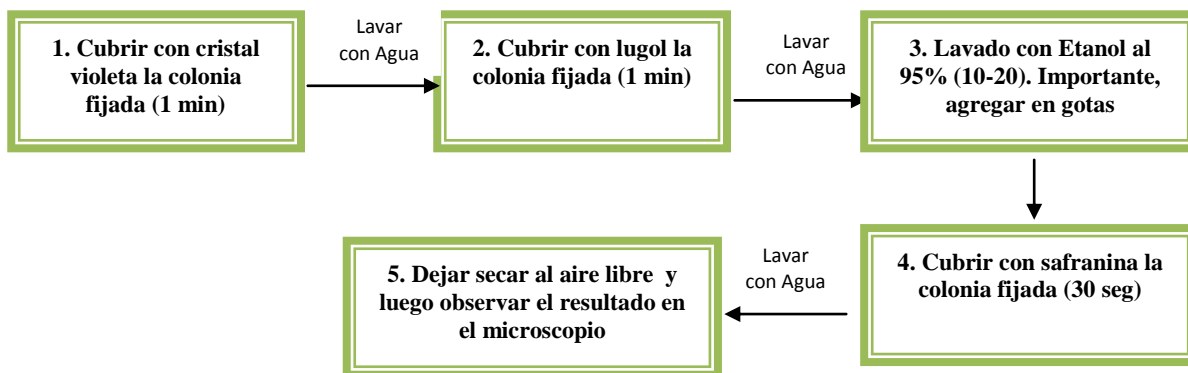
Figura 10. Rotulado de portaobjetos para tinción Gram. Esta figura muestra la forma en que se lleva a cabo la rotulación para la tinción de Gram. Una vez rotulada el portaobjetos, el montaje de la muestra y su posterior fijación se llevan a cabo al inverso de la rotulación en el portaobjetos.



Luego de rotularlos portaobjetos, se dio vuelta al mismo con el objetivo de que la bacteria no fuera trabajada en el mismo lado de la rotulación, sino en el revés. Se dejó caer una gota de agua destilada dentro del área del óvalo. Luego se tomó una pequeña porción de la bacteria con cualquier asa y se diluyó en la gota de agua, de forma que no quedaran partes de bacteria sin diluir. Se dejó secar al aire libre (aproximadamente 5 min o un poco más). Luego se fijó la bacteria al portaobjetos exponiéndolo a la flama del mechero (Importante: Se conservó el lado de la bacteria de forma que ésta no entrara en contacto directo con la flama, sino sea el anverso de donde fue diluida). Una vez fijada la bacteria, se llevó a cabo la tinción de Gram.

3. Determinación del tipo de Gram de la bacteria por medio de la tinción del mismo nombre. Luego de la fijación de la bacteria en el portaobjetos, se realizó la tinción de las mismas. Para ello, primero se agregó cristal violeta (de forma que cubriera la muestra) durante un minuto a la muestra ya fijada. Luego, se lavó con agua de chorro de forma suave pero consistente, logrando que se lave el colorante pero que no arruine la muestra. Inmediatamente después de dicho lavado, se agregó lugol (de forma que cubriera la muestra) durante 1 minuto. Se lavó con agua de chorro. Luego se decoloró utilizando etanol al 90% (o una mezcla de etanol al 90% más acetona). Este procedimiento duró entre 10 y 20 segundos, lavando posteriormente con agua de chorro. Finalmente se contra-tiñó con safranina (de forma que cubriera la muestra). Se esperó 30 segundos y luego se lavó con agua de chorro.

Diagrama 2. Tinción de Gram: Este diagrama ilustra los pasos que se siguieron para llevar a cabo la tinción de Gram y así identificar la morfología de las bacterias obtenidas.



Una vez realizado este procedimiento, se dejó secando al aire libre y luego se observó en el microscopio utilizando el objetivo 100X con aceite de inmersión. Se seleccionaron los bacilos teñidos de morado (Gram-positivo). Una vez comprobado el tipo de Gram que posee la bacteria, se procedió a llevar a cabo la comprobación de la especie por medios moleculares.

4. Extracción de ADN: Se realizaron seis protocolos de extracción de ADN los cuales se detallan a continuación.

a. Procedimiento descrito en Ayala *et al.* 2004

- En un microtubo de 1.5mL se colocan 200 μ L de buffer TE 1X (10mM Tris HCL pH 8, 1mM EDTA);
- Se adiciona a cada tubo una colonia de bacteria, y se agregan 200 μ L de solución de lisis 2X (4% triton-100X, 2% SDS, 200mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH. 8.0) y 10 μ L de proteinasa K (10ug/mL);
- Se mezcla por medio de un vortex y se incuba a 55°C por 30min. Después se mezcla con medio volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1,
- Se agita nuevamente con vortex, y se centrifuga a 9,300g por 5min.
- Se separa la fase acuosa y se deposita en otro tubo de 1.5mL estéril, se adicionan 200 μ L de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1),
- Se agita con vortex y se centrifuga por 5min a 9,300g.
- A continuación se extrae la fase acuosa, se coloca en un tubo nuevo, se le adiciona 200 μ L de acetato de amonio 7.5 M, y se incuba 10min en hielo.
- Se mezcla con inversiones suaves, se centrifuga durante 5min a 10,000rpm, y se adiciona 400 μ L de isopropanol frío.
- La solución contenida en el tubo se mezcla delicadamente, se incuba durante 30min a -20°C, y se centrifuga a 5min a 10,000rpm.
- El precipitado de ADN obtenido se disuelve en etanol frío (-20°C) al 70%. Una vez disuelto el precipitado, los tubos son sometidos a una centrifugación para posteriormente decantar el etanol; luego, los tubos se dejan abiertos hasta que se evapora el etanol.

- Finalmente se adiciona 200µL de buffer TE para disolver el ADN y guardar.

b. Procedimiento modificado por la Licda. Margarita Palmieri del protocolo de extracción de ADN de mosca blanca (Laboratorio de Protección Vegetal UVG).

- Diluir una colonia de bacteria en 50µL de Buffer de lisis (Proteinasa K 10mg/mL, Tris-HCL 1M pH 8.0, EDTA 0.5M pH 8.0, Noninet P-40).
- Agitar en vortex.
- Incubar a 70°C durante 15min.
- Agregar 1/10 de volumen de Acetato de Amonio y 2 ½ volumen de etanol 95% frío.
- Incubar a -20°C durante 1hora.
- Centrifugar a 14,000 rpm durante 10min.
- Decantar el etanol.
- Agregar 200µL de etanol frío al 70% y agitar suavemente (con el dedo índice).
- Centrifugar a 14,000rpm durante 5min.
- Decantar el etanol. Lavar con 200µL de etanol 95% frío y agitar suavemente.
- Centrifugar durante 5min a 14,000rpm.
- Decantar el etanol. Dejar secar los tubos eppendorf con la tapadera abierta y en una servilleta.
- Resuspender en 50µL de Buffer TE.

c. Procedimiento descrito por la Dra. Mónica Orozco.

- Centrifugar alícuotas de 300 µL de caldo de cultivo a 12,000g durante 5min.
- Remover sobrenadante.
- Agregar 300 µL de Buffer de Lisis Lisozima (100mM NaCl, 500mM Tris-HCl [pH8], Lisozima 10mg/mL).
- Incubar a 37°C durante 1 hora.

- Agregar 300 μ L de Buffer lisis SDS (100mM NaCl, 500mM Tris-HCl [pH8], 10% [wt/vol] SDS). Agitar en vortex.
- Centrifugar a 12,000g durante 5min. Trasladar sobrenadante a tubo nuevo.
- Agregar 500 μ L Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:1). Agitar en vortex durante 5seg.
- Incubar a 4°C por 5min, Centrifugar a 12,000g. durante 5min.
- Agregar 0.5 volúmenes de Acetato de Amonio 7.5M y 1 volumen de Isopropanol.
- Incubar a -20°C durante 15min. Centrifugar a 12,000g durante 10min.
- Lavar 3 veces con etanol 75% frío. Secar al aire libre. Resuspender pellet en 100 μ L de 10 mM Tris [pH8].

Si las bacterias no se incubaron en caldo de cultivo, se tomó una colonia de de bacteria crecida en NA, y se diluyó directamente en el los 300 μ L del Buffer de Lisis Lisozima del paso 3.

d. Extracción de ADN descrito en el manual del Kit Qiagen para extraer ADN total de bacterias Gram positivo. Este procedimiento se siguió tal como aparece en el manual del Kit de extracción de ADN total de bacterias Gram positivo. El kit utilizado es QiagenDNeasy Blood and Tissue Kit.

e. Extracción de ADN mediante hervor de colonias: Se diluyó una colonia de bacteria en 500 μ L de H₂O_d estéril. Se incubó a 95°C durante 5 minutos. Finalmente, se hizo directamente la amplificación deseada.

f. Extracción de ADN dirigida a plásmidos: Ólisis alcalina, enseñado por la Dra. Mónica Stein durante Ingeniería Genética del segundo semestre 2009, descrito a continuación:

- Pipetear 1.5mL de cada cultivo bacteriano en micro tubos de 1.5mL.
- Centrifugar de 1 a 2 min a 10,000 rpm para formar un pellet.

- Resuspender el pellet en 0.5mL de Buffer TE (10mM Tris HCL pH 8, 1mM EDTA).
- Centrifugar a máxima velocidad por 1 min.
- Descartar el sobrenadante y resuspender en el líquido residual.
- Agregar 300 µL de Buffer TENS (1X TENS incluye 50mM Tris-HCl [pH 8.0], 20mM EDTA, 100mM NaCl, 1% [peso/vol] SDS) y mezclar con vortex por 5seg.
- Revisar si la mezcla está pegajosa, si no lo está, agitar en vortex por 5secs más.
- Agregar 150 µL de Acetato de Sodio y mezclar con el vortex por 5seg.
- Centrifugar 2 min a 10,000 rpm para precipitar el ADN cromosómico y el residuo celular.
- Transferir el sobrenadante a un microtubo nuevo y mezclar con 0.9mL de etanol al 95% frío.
- Centrifugar a 10,000 rpm por 2 min para precipitar ADN y ARN y descartar sobrenadante.
- Lavar el pellet con 1mL de etanol al 70%.
- Dar un mini-espín.
- Lavar el pellet otra vez con 1mL de etanol 70%.
- Secar el pellet al aire por 10 min.
- Resuspender el pellet en 40 µL de buffer TE

5. Amplificación de plásmidos (Ver secuencias de cebadores en Cuadro 2 en Apéndice): A continuación se muestra las concentraciones finales utilizadas para amplificación de plásmido pCM1 (utilizando Cm3/Cm4; Sousa-Santos *et al.* 1997) y de pCM2 (utilizando Cm5/Cm6; Dreier *et al.* 1994).

Reactivo	C.f. PCR Cm3/Cm4	C.f. PCR Cm5/Cm6
Buffer con MgCl₂ (10X) Novagen	1X	1X
DNTP's	0.15mM	0.125mM
Forward	0.3μM	0.64μM
Reverse	0.3μM	0.64μM
TaqPol Novagen	1.25U	1.25U

El programa de termociclador (ependorf) para la amplificación de estos plásmidos se detalla a continuación.

Temperatura (en °C)	Tiempo
95	2 min
95	45 seg
62	1 min
72	1 min
Repetir 35 veces	
75	7 min

6. Amplificación de ARNr 16S (Ver secuencias de cebadores en Cuadro 2 en Apéndice): A continuación se muestra las concentraciones finales utilizadas para amplificación del ARNr 16S de las muestras (utilizando los cebadores 27F/1492R; Frank *et al.* 2008)

Reactivo	C.f.
Buffer GoTaq Flexi (5X) Promega	1X
MgCl₂	25mM
DNTP's	10mM
Forward	10μM
Reverse	10μM
GoTaq DNA Polymerase Promega	0.25U

El programa de termociclador (ependorf) para la amplificación de ARNr 16S es el que se detalla a continuación.

Temperatura (en °C)	Tiempo
94	5 min
94	45 seg
55	45 seg
72	45 seg
Repetir 35 veces	
75	5 min

7. Electroforesis: La electroforesis se realizó en geles de Agarosa al 1% durante 45min a 85 voltios. Se utilizó 5µL de producto de PCR con 1µL de buffer de carga (Loading Dye). Se utilizó 5µL de escalera 1Kb (Promega) y entre 2µL y 5µL de control positivo.

8. Secuenciación y Análisis de Secuencias: Las muestras que poseyeron amplificación del fragmento deseado (16S ARNr), fueron enviadas a secuenciar mediante el servicio de secuenciación de Macrogen con sede en Corea del Sur. Los resultados de secuenciación fueron analizados mediante bioinformática. Las secuencias consenso obtenidas del fragmento de 16S ARNr fue alineado usando BLASTn presente en la página web de NCBI para identificación de la colonia. Adicionalmente, las con las secuencias consenso también se realizó un árbol filogenético utilizando el método de Neighbor Joining con el programa CLC Viewer. Para ello, se utilizaron las secuencias consenso de las muestras obtenidas en este trabajo, las secuencias obtenidas por Canastuj (2011) y cinco secuencias de *Cmm* obtenidas del sitio web de NCBI.

III. RESULTADOS

Los resultados se muestran desglosados en diferentes secciones, siguiendo la cronología de la metodología descrita, para ayudar con la visualización y comprensión del tratamiento que fue aplicado a las muestras. Las primeras secciones sirvieron como base para poder avanzar a las siguientes. En cada una de las secciones, se muestran los resultados finales obtenidos. A pesar de que el trabajo se puede resumir a unos pocos cuadros y figuras de resultados, el procedimiento en sí tomó tiempo y fue difícil.

A. Morfología y Gram de las muestras

Esta es la primera parte del estudio y constó del aislamiento de colonias de bacterias que cumplieran con las morfologías características de bacterias Gram-positivo fitopatógenas. Las características de las bacterias aisladas incluyen poseer una colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, de colores preferentemente amarillo, amarillo huevo, amarillo verdusco claro, e incluso luego de revisar literatura, se determinó que blancas y pardas podrían ser tomadas en cuenta, siempre y cuando cumplieran con las primeras características. De las treinta y cinco (35) muestras procesadas, todas las bacterias de las colonias obtenidas a partir de tomate resultaron ser Gram-positivo. Adicionalmente, se encontró que 21 colonias aisladas eran bacilos, 13 cocos y 1 que no está bien definido si es bacilo o coco (Ver figuras 11, 12 y 13 en resultados, Cuadro 3 en resultados. Ver Cuadro 5 en ANEXOS para más detalles sobre los resultados).

Figura 11. Bacterias Gram-positivo analizadas. En esta figura se muestra la cantidad de bacterias Gram-positivo y Gram-negativo analizadas durante este estudio. Se puede observar que el 100% (35 muestras) de la totalidad de muestras analizadas fueron identificadas como Gram-positivo.

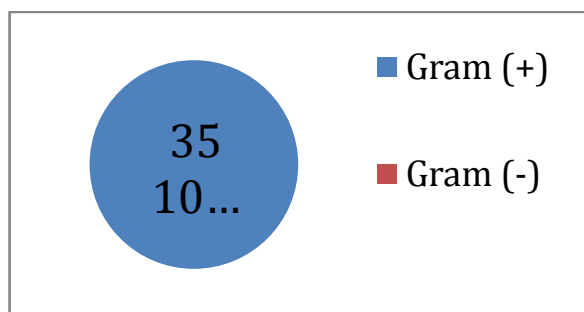
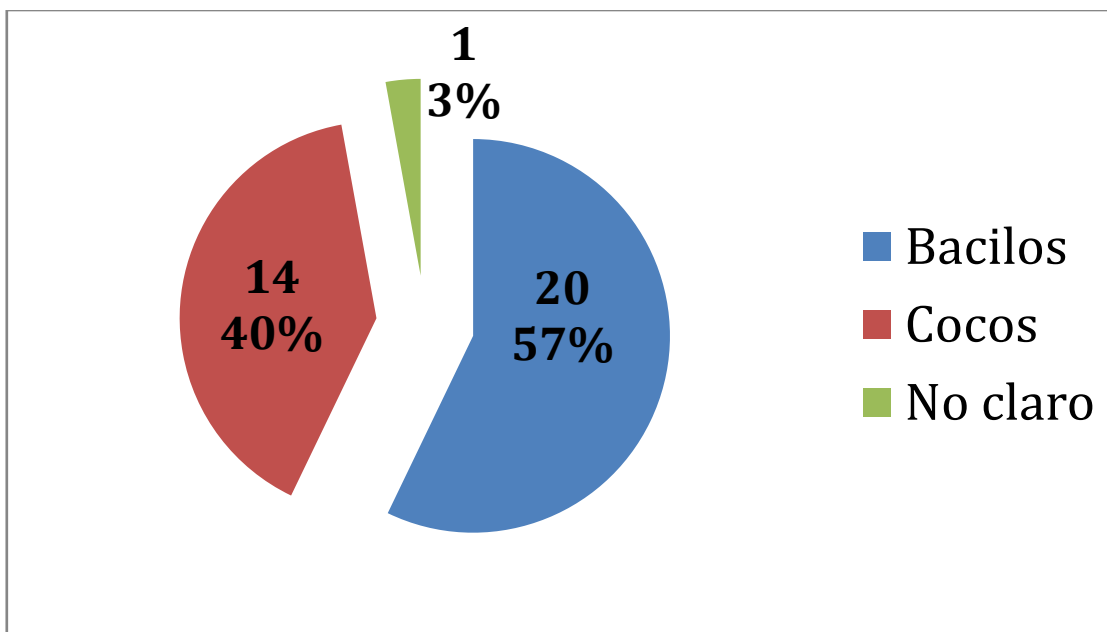


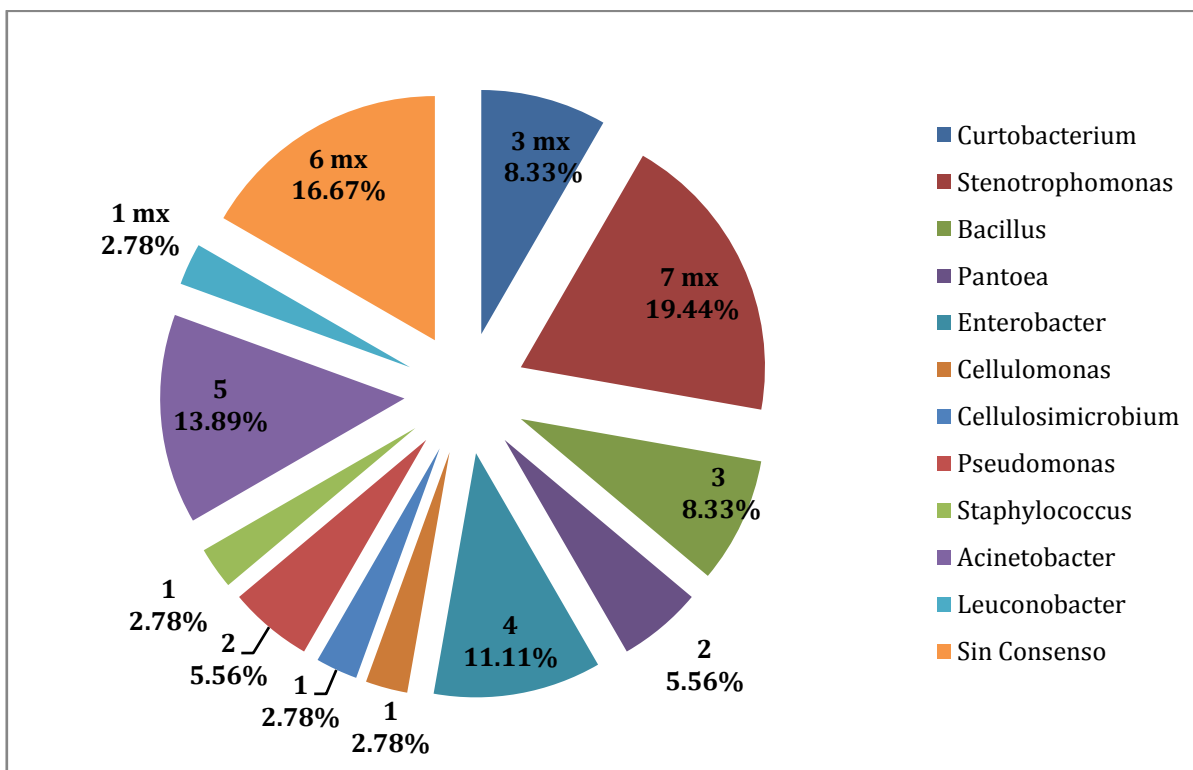
Figura 12. Cocos y bacilos en la muestra analizada. Esta figura muestra la distribución de cocos y bacilos en las muestras analizadas en este estudio. Se puede observar que el 57% (20 colonias) son bacilos, mientras que el 40% (14 muestras) son cocos. Sin embargo, a pesar del esfuerzo realizado, no se pudo identificar claramente la morfología de una colonia.



Cuadro 3. Resultados de identificación bacteriana por medio de pruebas moleculares. En este cuadro se detallan los géneros identificados, así como el total de muestras identificadas por género, los porcentajes que éstas muestras representan sobre el total de muestras analizadas y finalmente los números de identificación que corresponden a las muestras identificadas por género. Desafortunadamente, 6 muestras que representan el 16.67% del total de muestras (36) no pudo ser identificadas. Todas las muestras fueron secuenciadas utilizando el gen 16S rARN

Género	Total muestras	Porcentaje	No. de identificación
<i>Curtobacterium</i>	3	8.33%	PS001, PS007 y PS010
<i>Stenotrophomonas</i>	7	19.44%	PS002, PS006, PS016, PS017, PS019, PS032 y PS033
<i>Bacillus</i>	3	8.33%	PS003, PS013 y PS020
<i>Pantoea</i>	2	5.56%	PS005 Y PS012
<i>Enterobacter</i>	4	11.11%	PS008, PS009, PS022 y PS027
<i>Cellulomonas</i>	1	2.78%	PS015
<i>Cellulosimicrobium</i>	1	2.78%	PS18
<i>Pseudomonas</i>	2	5.56%	PS016 y PS030
<i>Staphylococcus</i>	1	2.78%	PS021
<i>Acinetobacter</i>	5	13.89%	PS023, PS028, PS029, PS031 y PS034
<i>Leuconobacter</i>	1	2.78%	PS024
Sin secuencia consenso	6	16.67%	
Total	36	100%	

Figura 13. Identificación molecular de las bacterias analizadas. Esta figura muestra la distribución de los géneros identificados utilizando el gen 16S rARN en el total de las muestras analizadas. Se puede observar que el género que presentó mayor cantidad (7) de colonias (mx) fue *Stenotrophomonas*, con un peso de 19.44%. Así mismo, los géneros menos representados en el total de muestras analizadas fueron *Cellulomonas*, *Cellulosimicrobium*, *Staphylococcus* y *Leuconobacter*, con una colonia cada uno. Finalmente, es importante resaltar que un alto porcentaje de muestras no pudo ser identificada debido a que la secuencia consenso no pudo ser determinada (Sin consenso, 16.67% y 6 colonias).



B. Ensayos moleculares

La primera parte de esta sección consistió en llevar a cabo una prueba piloto en la que se compararon diferentes métodos de extracción de ADN para determinar cuál era el que producía mejores resultados para este tipo de bacterias.

Los primeros métodos de extracción analizados fueron el protocolo 1 y 2 de este trabajo (Ayala *et al.* 2004 y mosca blanca respectivamente). La Figura 16 en Apéndice, muestra la efectividad comparada de ambos protocolos. Una vez extraído el ADN utilizando ambos protocolos de extracción para las mismas muestras, se amplificó mediante PCR utilizando cebadores Cm3 y Cm4. Para el PCR se utilizó diferente cantidad de ADN (1µL, 3µL y 5µL) para comparar, no solo los métodos de extracción, sino la cantidad de ADN necesaria para una buena amplificación.

En la Figura 16, se puede observar que el método de extracción de mosca blanca (protocolo 2 de extracción) presentó una buena amplificación para ambas muestras analizadas (28120A y MA), tanto para 1 μ L y 3 μ L como para 5 μ L. Como era de esperarse, la amplificación utilizando 1 μ L de ADN resultó en una banda tenue (menor concentración del fragmento amplificado) en el gel de electroforesis, a diferencia de la amplificación con 3 μ L y 5 μ L (presentando este último la banda más intensa).

Por otro lado, el procedimiento descrito en Ayala *et al.* 2004 (protocolo No. 1 de extracción) no funcionó para las muestras analizadas. Los métodos de extracción que incluía el uso de Kit de extracción de ADN genómico, el protocolo de extracción dirigida a los plásmidos y el protocolo de la Dra. Mónica Orozco no fueron exitosos en extraer los plásmidos para posterior amplificación (Datos no mostrados en este trabajo).

La segunda parte del estudio y constó de tres diferentes secciones. La primera sección consistió en determinar la identidad de las colonias analizadas utilizando el marcador molecular ARNr 16S mediante bioinformática, específicamente utilizando alineamientos tipo BLASTn en el sitio web de NCBI. Luego de la identificación de las colonias mediante ARNr 16S y BLASTn, se continuó trabajando en las siguientes secciones.

La segunda sección consistió en determinar la relación y semejanza de las secuencias obtenidas para las colonias de interés con respecto a las secuencias de ARNr 16S de cepas de referencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. La última sección constó de las pruebas de presencia de plásmidos pCM1 y pCM2 en las bacterias aisladas. Esta última sección se llevó a cabo mientras los productos de PCR para ARNr 16S fueron enviados a secuenciar.

1. Identificación de las colonias aisladas: Esta sección consta de la identificación de las bacterias utilizando ARNr 16S. El cuadro de resultados se presenta a continuación (para códigos de identificación ver Cuadro 5. en APÉNDICE).

Cuadro 4. Identidad de las muestras. Este cuadro muestra los resultados de varios BLAST utilizando las secuencias de ARNr 16S de las colonias de bacterias analizadas. También se muestra el largo del fragmento utilizado para hacer el BLAST, la MAX. IDENT y el E-Value.

Muestra	Id. blast	Longitud fragmento (bp)	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident.
PS001	<i>Curtobacterium</i> sp.	1366	2523	2523	100%	0.0	100%
PS002	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	1403	2575	2575	100%	0.0	99%
PS003	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1406	2597	2597	100%	0.0	100%
PS004	Sin secuencia consenso						
PS005	<i>Pantoea agglomerans</i>	1404	2558	2558	100%	0.0	99%
PS006	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	1394	2558	2558	100%	0.0	99%
PS007	<i>Curtobacterium</i> sp.	1354	2501	2501	100%	0.0	100%
PS008	<i>Enterobacter cloacae</i>	1393	2562	2562	100%	0.0	99%
PS009	<i>Enterobacter cloacae</i>	1403	2575	2575	100%	0.0	99%
PS010	<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>	1360	2507	2507	100%	0.0	99%
PS011	Sin secuencia consenso						
PS012	<i>Pantoea agglomerans</i>	1393	2547	2547	100%	0.0	99%
PS013	<i>Bacillus thuringiensis</i>	1387	2562	2562	100%	0.0	100%
PS014	Sin secuencia consenso						
PS015	<i>Cellulomonas</i> sp.	1363	2518	2518	100%	0.0	100%
PS015	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	1363	2512	2512	100%	0.0	99%
PS016	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1380	2549	2549	100%	0.0	100%
PS016	<i>Pseudomonas beteli</i>	1380	2543	2543	100%	0.0	99%
PS017	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1378	2534	2534	99%	0.0	99%
PS018	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	1359	2510	2510	100%	0.0	100%
PS019	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1406	2591	2591	100%	0.0	99%

Cuadro 4. Identidad de las muestras, continuación.

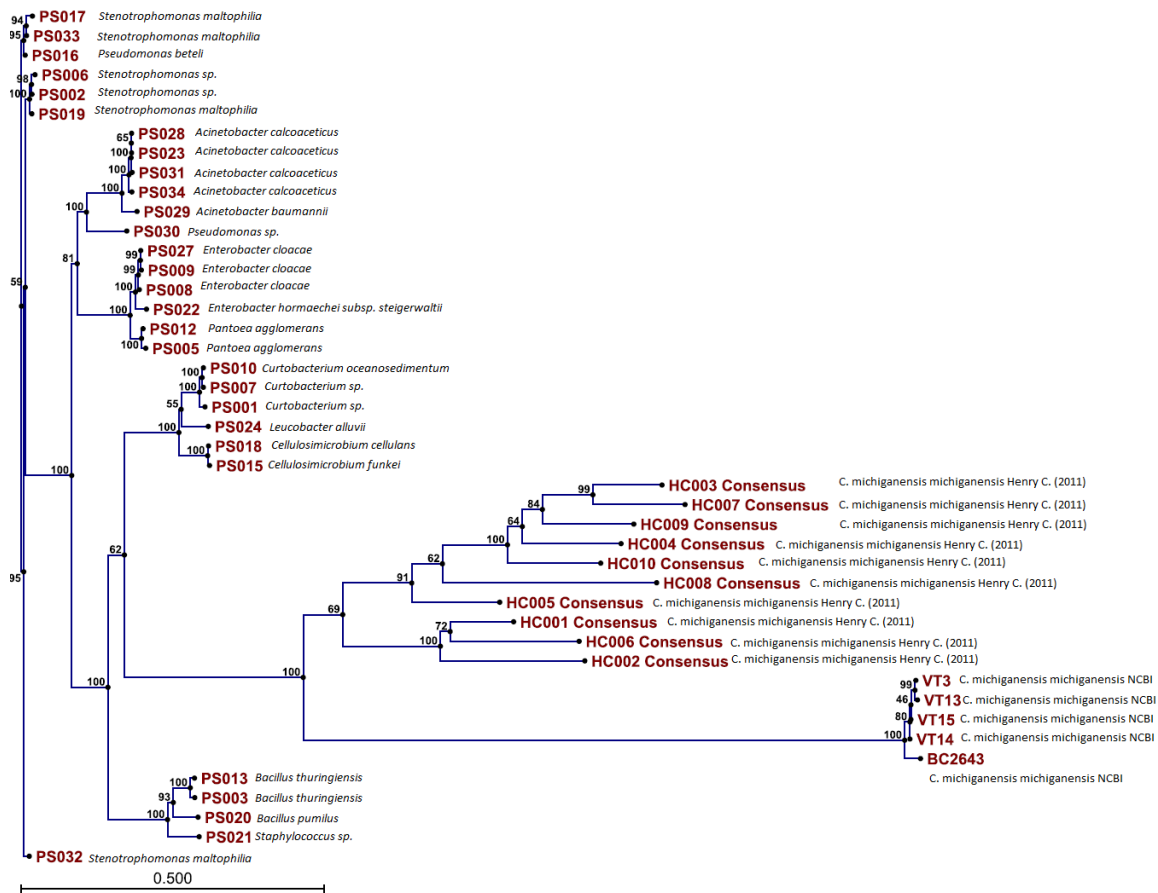
Muestra	Id. blast	Longitud fragmento (bp)	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident.
PS020	<i>Bacillus pumilus</i>	1390	2567	2567	100%	0.0	100%
PS021	<i>Staphylococcus</i> sp.	1402	2590	2590	100%	0.0	100%
PS022	<i>Enterobacter hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>	1381	2521	2521	100%	0.0	99%
PS023	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1396	2573	2573	100%	0.0	99%
PS024	<i>Leucobacter alluvii</i>	1379	2512	2512	99%	0.0	99%
PS025	Sin secuencia consenso						
PS026	Sin secuencia consenso						
PS027	<i>Enterobacter cloacae</i>	1400	2575	2575	100%	0.0	99%
PS028	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1397	2575	2575	100%	0.0	99%
PS029	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1403	2591	2591	100%	0.0	100%
PS030	<i>Pseudomonas</i> sp.	1375	2534	2534	100%	0.0	99%
PS031	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1400	2580	2580	100%	0.0	99%
PS032	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1404	2566	2566	100%	0.0	99%
PS033	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1390	2562	2562	99%	0.0	100%
PS034	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1385	2553	2553	100%	0.0	99%
PS035	Sin secuencia consenso						

De los resultados de BLASTn mostrados en el Cuadro 4, tres (3) muestras (PS001, PS007 y PS010) fueron identificadas como *Curtobacterium*, 7 muestras (PS002, PS006, PS016, PS017, PS019, PS032 y PS033) como *Stenotrophomonas*, 3 muestras (PS003, PS013 Y PS020) como *Bacillus*, 2 muestras (PS005 y PS012) como *Pantoea*, 4 muestras (PS008, PS009, PS022 y PS027) como *Enterobacter*, 1 muestra (PS015) como *Cellulomonas*, 2 muestras (PS15 y PS018) como *Cellulosimicrobium*, 2 muestras (PS016 y PS030) como *Pseudomonas*, 1 muestra (PS021) como *Staphylococcus*, 4 muestras (PS023, PS028, PS029, PS031 y PS034) como *Acinetobacter*, y 1 muestra (PS024) como *Leucobacter*. Adicionalmente, de 6 muestras (PS004, PS011, PS014, PS025, PS026 y PS035) no se pudo obtener secuencia consenso para llevar a cabo los análisis. Interesantemente, tanto PS015 como PS016 presentaron doble identificación. PS015 fue identificada por el BLASTn como *Cellulomonas* sp. y como *Cellulosimicrobium funkei*; mientras que para PS016 fueron *Stenotrophomonas maltophilia* y *Pseudomonas beteli*.

2. Relaciones y semejanzas de muestras con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*: En esta sección, se comparó la secuencia obtenida de la región ARNr 16S de las muestras aisladas con regiones ARNr 16S de cepas de referencia de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* obtenidas en la base de datos de NCBI.

Los resultados del árbol filogenético llevado a cabo con secuencias consenso (Figura 14) muestra que, las secuencias de las cepas de referencia de *Cmm* son, como ya se esperaba, muy similares entre sí. Interesantemente, las secuencias de las cepas obtenidas por Canastuj (2011) que fueron identificadas como *Cmm* son muy similares entre sí (muestras HC001-HC010). Sin embargo, presentan un alto grado de disimilitud y muestran alta lejanía con respecto a las cepas de referencia obtenidas de la base de datos de NCBI. Se puede observar que el primer clúster abarca los géneros *Stenotrophomonas* y *Pseudomonas*, el segundo abarca los géneros *Acinetobacter*, el tercero *Enterobacter* y *Pantoea*, el cuarto *Curtobacterium*, *Leucobacter* y *Cellulosimicrobium*. El quinto cluster incluye *Cmm*, tanto de HC como de referencia. El último cluster incluye *Bacillus* y *Staphylococcus*.

Figura 14. Árbol de agrupamiento de muestras y secuencias de referencia. Esta figura muestra la relación entre las muestras analizadas utilizando el alineamiento de las secuencias (BLASTn) del gen ARNr16S con respecto a cinco cepas de referencia encontradas en NCBI (VT3, BC2643, VT13, VT14 y VT15) y cepas de *Cmm* identificadas previamente en el laboratorio (HC001-010). El alineamiento y el árbol se realizaron en CLCviewer 5.0 versión Demo. El árbol se hizo mediante Neighbor Joining.

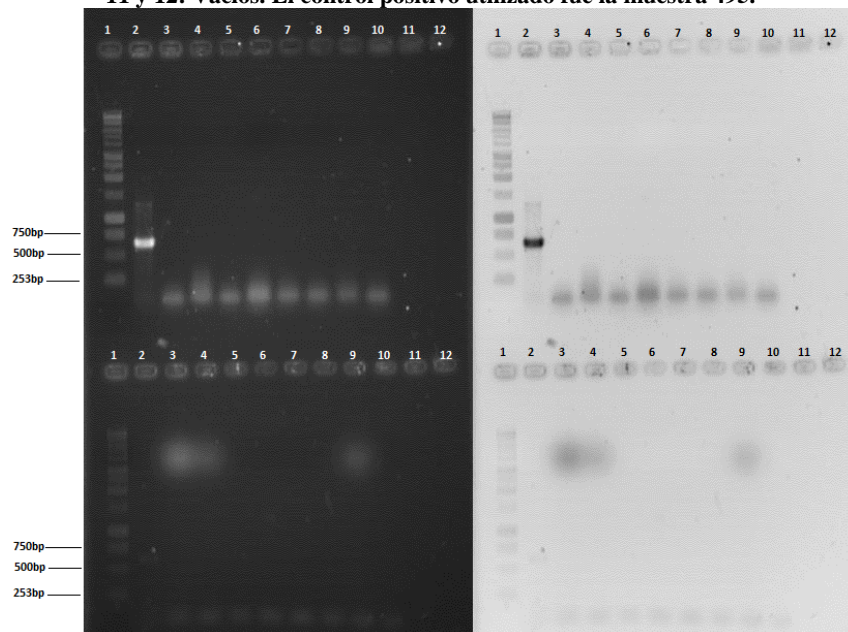


Tanto el clúster 1 como la muestra PS032 son los más diferentes del resto de las muestras. PS032 se mostró estar independiente en el árbol obtenido, aunque se esperaba que estuviera dentro del clúster 1. Los resultados obtenidos son bastante congruentes, en donde las secuencias más parecidas fueron agrupadas en clústers que diferían de aquellas secuencias que eran más disímiles. Sin embargo, la muestra PS016, PS030 y PS032 fueron agrupadas de forma no esperada, y a pesar de PS016 y PS030 ser el mismo género (*Pseudomonas*), fueron agrupados en diferentes clústers (PS016 con *Stenotrophomonas* mientras que PS030 con *Acinetobacter*). Por otra parte, PS032 (*Stenotrophomonas*) fue excluida del clúster 1 (al que debió haber pertenecido) y fue dejada como muestra única de su clúster.

3. Pruebas de presencia de plásmidos pCM1 y pCM2 en las bacterias aisladas:

En esta sección se realizaron pruebas moleculares para determinar la presencia o ausencia de los plásmidos pCM1 y pCM2 en las bacterias aisladas. En la Figura 15, se muestra un ejemplo de geles de electroforesis de agarosa 1%, de presencia y ausencia de dichos plásmidos en diferentes muestras.

Figura 15. Electroforesis Cm3/Cm4 y Cm5/6 del 14 de Julio del 2011. Esta electroforesis muestra el resultado de la amplificación de los fragmentos correspondientes a Cm3/4 y Cm5/6. El peine 1 corresponde a Cm3/4 y el peine 2 a Cm5/6. El ADN de estas muestras (grupo 2) fue extraído hirviendo la colonia y luego haciendo una dilución de 1/500 para PCR. El orden de las muestras es como sigue: PEINE 1. MPM 1kb promega; 2. Control positivo; 3. PS019; 4. PS035; 5. PS021; 6. PS029; 7. PS020; 8. PS023; 9. PS030; 10. PS031; Pozos 11 y 12: Vacíos. PEINE 2: 1. MPM 1kb promega; 2. CTRL (+). 3. ; 4. PS035; 5. PS021; 6. PS029; 7. PS020; 8. PS023; 9. PS030; 10. PS031; Pozos 11 y 12: Vacíos. El control positivo utilizado fue la muestra 495.



IV. DISCUSIÓN

Las bacterias estudiadas en este trabajo son tipo Gram-positivo. La literatura consultada hace énfasis en que las técnicas moleculares de análisis y diagnóstico, ya estandarizadas, para bacterias Gram-negativo, no producen resultados igual de convincentes en bacterias tipo Gram-positivo. Es por ello, que sumado a las secciones descritas en resultados, se examinaron varios métodos de extracción de ADN que pudiera brindar los resultados esperados y permitir los análisis posteriores.

A. Morfología y Gram de las muestras

De acuerdo con las pruebas morfológicas y de tinción Gram (ver Cuadro 3 en Resultados), la mayoría de las bacterias aisladas son bacterias Gram-positivo. Debido a que el énfasis adicional de este estudio fue aislar *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, todas las bacterias que cumplieran con las características morfológicas deseadas fueron aisladas y tomadas para este estudio. Para evitar descartar colonias que posiblemente eran la bacteria de interés, se procedió a utilizar todas las muestras candidatas, incluyendo aquellas que resultaran negativas para la tinción de Gram (solamente para la primera parte del estudio). La mayoría de las colonias observadas en un microscopio Leica con el objetivo de 100X, resultaron ser claramente bacilos o cocos. Las cepas se aislaron de acuerdo con las características reportadas en la literatura. Sin embargo, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* es tan variable fenotípicamente, que una siembra convencional (en medio general de Agar Nutritivo) no brinda resultados convincentes como factor de identificación. Se realizaron pruebas preliminares de siembra en medio semi-selectivo, sin embargo, el aislamiento no fue exitoso. Más aún, se observó el crecimiento de muchas colonias ajenas a la deseada, e incluso crecimiento de hongos; indicadores de la falta de selectividad del medio. Adicionalmente, para el tiempo del estudio, la totalidad de reactivos necesarios para realizar un medio semi-selectivo no estaban disponibles; lo que evitó futuras pruebas y probablemente influyó directamente en la falta de selectividad en las pruebas preliminares.

En cuanto a la morfología de las colonias, hay una amplia variabilidad. La revisión de literatura indica que la morfología de bacterias patógenas Gram-positivo, especialmente *Cmm*, presentan una alta variabilidad fenotípica, presentando colonias que varían en colores desde blanco hasta pardo. Sumado a esto, la dificultad al aislamiento de las mismas hace que el análisis morfológico de las colonias produzca resultados poco confiables. Se intentó aislar colonias que presentaran los rangos de color reportados (desde amarillo blancuzco hasta amarillo fuerte). Lo anterior, sumado a la carencia de un medio específico para aislamiento, hizo que este proceso fuera muy difícil y subjetivo, ya que dependía del ojo del investigador. Al carecer de un medio selectivo (o incluso semi-selectivo) de cultivo, las bacterias deseadas no pudieron aislarse y se observó la presencia de bacterias con morfología similar. Es posible que dichas bacterias hayan estado presentes en la superficie o interior de la semilla y plántula y en el laboratorio. Se ha reportado que muchas de las bacterias co-cultivadas con *Cmm* son antagonistas, lo que hace que el aislamiento y crecimiento de *Cmm* en caja de Petri sea difícil. Más aún, es posible que dichas antagonistas inhiban el crecimiento de *Cmm*.

B. Ensayos moleculares

Se observó en la prueba piloto para los métodos de extracción de ADN y amplificación de fragmentos de ADN plasmidial que el método de extracción de mosca blanca que consiste en hervir la bacteria en buffer de lisis (ver metodología), brindó mejores resultados que un procedimiento más complejo que incluye limpieza química del ADN, como el de Ayala *et al.* 2004, el del Kit de Extracción de ADN genómico, el procedimiento para extracción de ADN plasmidial y que la metodología de la Dra. Mónica Orozco. Estos resultados fueron confusos y al momento de finalizar este estudio todavía no se conoce la razón por la cuál no funcionaron estos métodos. Interesantemente, Ayala *et al.* (2004) reportaron que dicho método funcionó para la amplificación de plásmidos de *Cmm*. Es posible que los métodos de extracción de ADN genómico hayan sido insuficientes para mantener los plásmidos durante la extracción, ya que se basan en el tamaño del ADN genómico y no del plasmidial. Sin embargo, para el tiempo en que se realizó la prueba piloto, no se contaba con los cebadores para 16S ARNr para identificar si las colonias

aisladas eran *Cmm*. Durante este período, los esfuerzos fueron frustrantes ya que no se sabía si los métodos de extracción eran los que fallaban, si las colonias analizadas eran efectivamente *Cmm* y no alguna otra bacteria; y finalmente (en caso de que el método funcionara y la colonia fuera efectivamente *Cmm*), no se sabía si el problema de falta de visualización de banda en el gel era debido a una pérdida de plásmidos durante resiembra (que interesantemente había sido previamente reportado en la literatura consultada); impidiendo determinar si las cepas locales de *Cmm* carecían de alguno de los plásmidos (ambas reportadas previamente en la literatura), añadiéndole dificultad a este trabajo.

Por otra parte, de acuerdo con la teoría evolutiva y los análisis filogenéticos, un género es un taxa que debe poseer especies similares, es decir, la diferencia entre especies de un mismo género deben ser menores a las diferencias entre especies de géneros distintos. Es por ello, que se escogió el método de extracción de Ayala *et al.* 2004 basándose en el hecho que *Cmm*, por ser del mismo género y misma especie que *C. michiganensis* subsp *nebraskensis* (*Cmn*, analizada en Ayala *et al.* 2004), debería presentar resultados similares a los obtenidos en Ayala *et al.* 2004, que amplificaron exitosamente los plásmidos en *Cmn*. Sin embargo, nuestros resultados de amplificar los plásmidos de *Cmm* fueron negativos utilizando el mismo método. Si bien no se sabe la razón detrás de esto, se sospecha que dichos resultados se deban a que los plásmidos pudieran presentar suficiente diferencias entre *Cmm* y *Cmn* que impida la amplificación utilizando los mismos cebadores y mismo método de extracción. Por otra parte, tampoco se debe descartar el hecho de que el método se haya realizado mal (desde el punto de vista de errores en técnicas de trabajo como en preparación de reactivos) o que, como se mencionaba anteriormente, se haya sobreestimado el parentesco de ambas subespecies.

El protocolo de extracción de ADN de mosca blanca se utilizó para probar la amplificación utilizando los cebadores Cm5/Cm6. Las mismas muestras fueron utilizadas (28120A y MA). Sin embargo, para el caso de Cm5/Cm6, el utilizar 5µL de ADN para amplificación, no resultó en una banda intensa como se observó con Cm3/Cm4 (ver Figura 16 y 17 en Apéndice). De acuerdo con la literatura, una cepa altamente virulenta de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, es aquella que posee tanto el plásmido pCM1 (al que

está dirigido los cebadores Cm3/Cm4) como pCM2 (al que está dirigido los cebadores Cm5/Cm6). No obstante, se pueden encontrar cepas poco virulentas (poseyendo uno de los plásmidos) o incluso avirulentas (sin plásmidos). Esto quiere decir, que la presencia o ausencia de alguno de los plásmidos por sí solo no presenta un diagnóstico confiable. No se encontró en la literatura información sobre qué plásmido era más abundante en las cepas de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ni qué proporción entre ambos plásmidos se presenta en las cepas altamente virulentas; sin embargo, según los resultados obtenidos (sabiendo que es más fácil llevar a cabo un PCR exitoso utilizando Cm3/Cm4 que Cm5/Cm6), pareciera ser que pCM1 es mucho más abundante que pCM2. Un mayor número de copias del plásmido pCM1 podría indicar que dicho plásmido es más estable en *Cmm* que pCM2. De ser esto cierto, y que la concentración de pCM1 sea mayor que pCM2, se verá reflejado por la intensidad de las bandas del producto de PCR pCM1 comparado con el producto de PCR pCM2 (que se espera que haya bandas más tenues para Cm5/6 incluso en mayores concentraciones que pCM1). Esto podría indicar que es posible que exista una correlación entre la concentración de pCM1 vs. pCM2, como se observó en este estudio. Sin embargo, más pruebas se necesitan, específicamente orientadas a medir las concentraciones o número de copias de los plásmidos (por ejemplo, PCR de tiempo real – qPCR-). No se debe descartar el hecho de que la receta para PCR no sea la adecuada o que se esté haciendo erróneamente, ya que si los reactivos no están en óptimas concentraciones se puede obtener baja eficiencia de amplificación, dar resultados equivocados o incluso inhibir el PCR.

Se hicieron diferentes pruebas utilizando el protocolo de extracción de ADN mosca blanca, en los que se varió la cantidad de ADN utilizado para la amplificación, y así determinar si funcionaba el método (Ver Figura 18 en Apéndice). Como era de esperarse, las muestras no se pudieron utilizar puras (sin diluciones) ya que el método de extracción de ADN mosca blanca, no pasa por una serie de limpiezas químicas que pueda llevarse a cabo en otros protocolos. Incluso a diluciones 1/10, como muestra la Figura 18, todavía existe mucha contaminación, ADN residual y más importante, gran parte del ADN genómico queda en la muestra (reflejado como una banda intensa o medianamente intensa)

de un tamaño aproximado de 10,000 bp. Esto indica, que existe mucho más ADN genómico que ADN plasmidial (en caso estar presente). Si bien, algunas bandas presentan amplificación exitosa con Cm3/Cm4 (muestra 207p), la mayoría carece de ella. Todo este proceso es muy complejo, ya que la morfología de las colonias de bacterias aisladas desde la planta no es un factor muy confiable de identidad microbiana. Finalmente, lo más complicado era saber, si las muestras que se estaban analizando presentaban, primero que nada los plásmidos. También, es ampliamente conocido que las cepas de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* tienden a perder los plásmidos y la virulencia durante el aislamiento. La dificultad del estudio, en cuando al aislamiento de bacterias deseadas, incluye que al carecer de un medio selectivo o semi-selectivo, se necesitan de más “resiembras” para poder aislar más eficientemente la bacteria deseada. El problema con el exceso de resiembras, es que se pierden los plásmidos y es posible que durante alguna resiembra en medio no selectivo no se haya tomado la muestra de la bacteria deseada, sino de alguna otra. Esto representó otro grave problema y varias preguntas, como por ejemplo, si las cepas analizadas habían perdido los plásmidos, si las técnicas moleculares no lo estaban detectando (empezando por el hecho de que en el método de extracción se haya eliminado los plásmidos) o si las cepas analizadas no eran *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

En el laboratorio de Protección Vegetal y Fitopatología de la Universidad del Valle de Guatemala, había un Kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue, teniendo dentro de todo su conjunto de protocolos, uno específico para extracción de ADN total de bacterias tipo Gram positivo. Se realizaron las extracciones siguiendo el manual del kit (nombrando a este protocolo como No. 3). Se realizó la amplificación del fragmento Cm3/Cm4 para algunas muestras extraídas con el kit (Ver Figura 19 en Apéndice). Se puede observar que las muestras que presentaron extracción con el kit presentan una banda intensa en la parte superior del gel (aproximadamente 10,000 bp). Esto indica que el kit funcionó muy bien para extraer ADN cromosomal, sin embargo para los propósitos del estudio, tanto ADN genómico íntegro pudo haber inhibido la amplificación de los plásmidos, o simplemente, el Kit no ayudó a retener los plásmidos, sino que se perdieron en las eluciones (suponiendo que alguna de las muestras haya sido *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*). Otra cosa

interesante se puede observar en la Figura 19. La primera parte del gel posee inyección del producto de PCR utilizando Cm3/Cm4, en donde el ADN se extrajo con el método de mosca blanca. Sin embargo, a estas alturas del estudio habrían pasado dos cosas: 1. Que el método de mosca blanca ya no funcione, por lo que no hubo amplificación; o la más interesante, 2. Al parecer hubo pérdida de plásmidos, al menos en una muestra. La primera prueba de protocolos de extracción, en la que funcionó el método de mosca blanca, fue llevada a cabo el 09 de Noviembre del 2010. Para cuando se hizo la prueba del kit, era ya 25 de Abril del 2011. Varias re-siembras habían sido llevadas a cabo de las bacterias de la muestra MX (que es la misma muestra MA mencionada con anterioridad).

Dicha muestra fue amplificada utilizando el ADN extraído con el método de mosca blanca y con el Kit (Figura 19). Sin embargo, incluso la extracción de mosca blanca para esta muestra, que ya había funcionado y había logrado una muy buena amplificación, ya no dio resultados para esta prueba. Esto indica la posible pérdida de pCM1 en dicha muestra, lo que concuerda con lo encontrado en literatura; ya que luego de algún tiempo de estarlas cultivando, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* pierde los plásmidos. Una última opción no debe ser descartada, y es el hecho de que en el cultivo de dicha muestra haya habido *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, sin embargo, luego de algún tiempo y debido a la tasa lenta de crecimiento de la misma, dicha colonia haya sido inhibida por algún antagonista de más rápido crecimiento; lastimosamente, no se pudo identificar ya que las pruebas de identificación de ARNr 16S para esa fecha, aún no se hacían. Para no seguir dependiendo de muestras que ya tenían tiempo de estar sembradas, se procedió a realizar nuevos aislamientos utilizando las semillas listadas en el Cuadro 8 en Apéndice. Debido a que estas semillas serían sembradas en medio de Agar Nutritivo (NA), se realizó dos tipos de siembra. 1. La semilla se dejó en NA entera (rotulando con el número de la muestra y la palabra “ent”). 2. La semilla se cortó por la mitad y ambos pedazos se pusieron en NA dejando en contacto la parte que fue cortada (rotulando con el número de la muestra y la palabra “cort”). Esto se hizo para evitar reducir al mínimo los errores de obtención de colonias, ya que las semillas de por sí, traen diferentes bacterias asociadas, tanto dentro como fuera de la de semilla. Se sabe que *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* es una

bacteria endógena, por lo que se cortó la semilla para obtenerla. Luego de llevar a cabo la determinación del Gram de las muestras, su descripción física y la forma que tenían, se procedió a realizar la extracción de ADN con el kit, ya que se había visto que éste sí funcionaba para extraer ADN genómico de muy buena calidad, y lo que seguía era identificar todas las muestras analizadas utilizando el gen ARNr 16S. Se ha reportado en literatura que dicho gen está presente en el genoma y hay varias copias, además de ser un marcador molecular altamente utilizado en filogenia e identificación. Ello, llevó a su uso como identificador de las bacterias para este estudio. Ya que se mencionó que el gen está presente en el ADN genómico, y el kit extrae muy bien este último, se utilizó el kit como algo seguro para obtener dicho ADN y lograr una buena amplificación del ARNr 16S para la identificación de las muestras. Como resultado de la prueba realizada para determinar si el kit de extracción daba ADN de buena calidad para amplificar utilizando los cebadores 27F y 1492R, surge la Figura 20 en Apéndice. Aquí se puede observar que la amplificación del fragmento de ARNr 16S fue exitoso y presenta una banda intensa, indicando que hay bastante cantidad de ADN (incluso luego de diluir a 1/50).

Sin embargo, a pesar de que el ADN extraído con kit, logra una buena amplificación y una limpieza muy buena, siempre queda exceso de ADN ya que se está trabajando directamente de las colonias de bacterias (sin ninguna purificación adicional). El exceso de ADN se observa en la Figura 20 como una banda en 2000 bp incluso luego de la dilución 1/50. Es por ello que se decidió realizar diluciones hasta de 1/100 para eliminar ese exceso; cosa que se logra con éxito y está ejemplificada en la Figura 21 en Apéndice. A pesar de que en esta figura en las muestras se sigue observando una “nube de corrido” por el exceso de ADN, ya no presenta la banda de 2000 bp. Por lo ello, se procedió a hacer los triplicados de las amplificaciones del gen ARNr 16S (para enviar a secuenciar luego) para todas las muestras del grupo 1, utilizando dilución 1/100, ya que se sabía que el kit de purificación de producto de PCR limpiaría el exceso de ADN. Uno de los compañeros trabajando en el mismo tema, logró extraer ADN de buena calidad para amplificar ARNr 16S mediante un método distinto pero simple. Este se convirtió en el protocolo No. 5 de extracción de ADN y consiste en extraer ADN diluyendo una colonia de la bacteria en 500 μ L de agua y

dejando hervir a 95°C durante 5min. Esto resultó en la obtención de ADN de las muestras del grupo 2, para luego ser amplificadas con los cebadores 27F y 1492R. El resultado se muestra en la Figuras 23 y 24 en Apéndice. Sin embargo, debido a que este proceso no posee limpieza, las diluciones de ADN de la bacteria tuvieron que llegar hasta 1/500 para poder amplificar la banda de 1500bp reportada para ARNr 16S, sin ninguna otra amplificación no deseada o impureza. Esto se realizó con éxito. Este método puede proveer a las personas que estén trabajando con ARNr 16S un método rápido, barato, eficiente y exitoso de extracción a partir de bacterias, incluso Gram positivo. Con las muestras estudiadas, luego de las amplificaciones correspondientes para ARNr16S, se realizaron triplicados del PCR para cada muestra. Esto se hizo con el fin de obtener suficiente producto de PCR para enviar a secuenciar. Luego de los triplicados y de la limpieza del producto de PCR, las muestras ya presentaban una banda fina, bien definida, intensa y sin mucho exceso de ADN (Ver Figuras 25 y 26 en Apéndice). Estas muestras, ya listas para secuenciar, se enviaron a MacroGen con sede en Corea. Unos días después se obtuvieron los resultados de las secuencias vía correo electrónico.

Luego de obtenidas las secuencias de las colonias, se procedió a editar los lados menos confiables de las secuencias utilizando la opción “Trim” en Sequencer, dejando así los nucleótidos más confiables en la secuencia ya limpia. Luego se utilizó el mismo programa para producir una secuencia consenso (ya que la secuenciación incluye 2 secuencias del mismo gen, una desde el fragmento amplificado con 27F y otra en dirección inversa amplificada con 1492R). Una vez obtenido el consenso, se realizó un BLAST de nucleótidos en NCBI para cada consenso, obteniendo así una posible identidad de la colonia analizada (ver Cuadro 4 en Resultados). Luego del alineamiento, NCBI brinda valores para “Max Score” y el “Total Score”. Éstos dependen de la longitud de la secuencia, en donde una secuencia mayor contribuye a un mayor puntaje en estos. Por ello, estos resultados siempre deben compararse con el largo de la secuencia. El “Query Coverage”, indica el porcentaje de la secuencia que se utilizó para hacer el análisis, el “e-value” es un valor que depende del tamaño de la base de datos con la que se compara la muestra. Para bases de datos pequeñas, un e-value mayor es considerado de tener mayor

significancia que uno menor, sin embargo, NCBI posee una base de datos muy grande, por lo que valores entre 0.0 y 0.01 son más significativos que valores mayores a estos. Finalmente el “Max Identity” indica el porcentaje de nucleótidos compartidos en la base de datos. Hubo problemas con las secuencias de algunas muestras, ya que no presentaba un claro resultado de secuenciación (presentando N en vez de algún nucleótido), por lo que al hacer el “Trim” cortaba casi toda la secuencia de ambos cebadores (o de al menos uno), evitando así, poder obtener la secuencia consenso para el análisis posterior (ver Cuadro 4 en Resultados). Probablemente, esto se debió a que la muestra enviada a secuenciar, no estaba lo suficientemente pura como para dar un resultado satisfactorio y confiable.

Ninguna colonia analizada en este estudio era *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Hubo resultados muy variados, pero ninguna era la bacteria a la que se había enfatizado. Los resultados de la identificación molecular de las bacterias fue, la obtención de diferentes especies de presentes en las semilla de tomate, siendo dichas bacterias pertenecientes a los géneros *Curtobacterium*, *Bacillus*, *Staphilococcus*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Strenotrophomonas*, *Cellulomonas*, *Cellulosimicrobium*, *Acinetobacter* y *Leucobacter*, y es muy probable que dichas bacterias sean endofíticas y hayan sido detectadas por el simple hecho de estar en el tejido de tomate. Las bacterias endofíticas son bacterias que viven en tejidos vegetales, sin causar daño alguno o sin obtener ventaja de organismo en que habita (Kim *et al.* 2002). Las bacterias endofíticas pueden ser aisladas desde tejidos vegetales, aún siendo desinfectados en su superficie, o desde extracto de tejido vegetal interno. Tanto bacterias endofíticas tipo Gram-positivo como Gram-negativo han sido aisladas a partir de varios tipos de tejido en numerosas especies de plantas (Kim *et al.* 2002). Incluso, diferentes especies de bacterias han sido aisladas de una sola planta. Variaciones significantes en las poblaciones, tanto de endófitas nativas del hospedero, como introducidas han sido reportadas (Kim *et al.* 2002). Estas variaciones han sido atribuidas a la especie de planta de donde se han aislado las bacterias, la edad de la planta, el tipo de tejido, tiempo de muestreo e incluso el ambiente. Generalmente, las poblaciones bacterianas son mayores en las raíces y decrecen en los tallos y las hojas (Kim *et al.* 2002).

Curtobacterium, es una bacteria tipo Gram-positivo del suelo. Es el único representante de Actinobacteria y ha sido identificada en cultivos de naranja, uva y pino (Magnani *et al.* 2010). De acuerdo con Magnani *et al.* (2010), su trabajo puede ser la primera caracterización de *Curtobacterium* en caña. Por otro lado, ha habido reportes de aislamiento de *Bacillus* y *Staphylococcus* en Chile pimiento (Rasche *et al.* 2006). *Bacillus thuringiensis* que fue encontrada en las muestras analizadas, es una bacteria tipo Gram-positivo (Sauka y Benintende 2008). También se ha reportado que *B. thuringiensis* puede presentarse de forma natural en el intestino de las orugas de algunos Lepidópteros, así como, en las superficies poco iluminadas de las plantas. Dada la diversidad genética en el género *Bacillus*, tanto en el suelo como en la rizosfera, se considera a estos microorganismos como colonizadores eficaces. Las bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* son consideradas las más eficaces para controlar enfermedades foliares y de las raíces. A la vez, estas mismas especies están presentes en el suelo, cumpliendo su principal rol ecológico que es la descomposición (Magnani *et al.* 2010).

Enterobacter, es un género de bacterias encontrado principalmente en las ramas de algunas plantas, siendo identificada endófito de plantas tales como *Citrus sinensis*, soya y plantas de cultivo (Magnani *et al.* 2010). Esta bacteria es un bacilo de tipo Gram-negativo, que se encuentra desde la piel humana, hasta plantas y el suelo, desagües, tractos digestivos de humanos y animales. Sin embargo, algunas especies de este género (como *E. cloacae* y bacterias similares) han sido encontradas en pepino, semillas de rábano, arvejas, soya, margaritas y semillas de elote dulce (Magnani *et al.* 2010). *Pantoea* es una bacteria Gram-negativo y es conocida por ser un patógeno oportunístico. Comúnmente se aísla de las superficies de plantas, semillas y frutos, así como de heces animales o humanas. *Pantoea* como endofítica ha sido reportada para la caña y la soya. Representantes de este género también han sido asociados con patogenicidad (Magnani *et al.* 2010; Medrano and Bell 2007). *Pseudomonas* es un género de bacterias que generalmente domina en presencia en tejido vegetal, especialmente en hojas. En tomate produce mancha o marchitez bacteriana. Son organismos Gram-negativo, estando presentes tanto en suelos limpios como en suelos contaminados. Puede ser encontrada en muchos ambientes diferentes, tales como suelo,

agua y tejido animal y vegetal. Generalmente, esta bacteria puede tolerar una gran variedad de condiciones físicas, y cuando es patógena, ataca el Xilema y Floema marchitando así, la planta hospedera (Magnani *et al.* 2010). En tomate, produce pequeñas manchas necróticas en los folíolos, siempre rodeadas de una aureola clorótica muy característica (Magnani *et al.* 2010; Blancard 1990).

Stenotrophomonas es un género de bacterias del tipo Gram-negativo. Tiene especies en lugares de organismos del suelo comunes (como *S. nitritireducens*) hasta patógenos oportunistas humanos (*S. maltophilia*). Este género de bacterias está ampliamente distribuido en el ambiente y ha sido aislado de hábitats variables desde suelo, agua hasta diferentes especies de plantas que funcionan como hábitat. Son capaces de colonizar varias secciones de la planta de tomate, chile pimiento y algodón (Magnani *et al.* 2010). *Cellulomonas* es un género de bacterias Gram-positivo, son bacilos irregulares en el grupo de los coryneiformes. Están ampliamente distribuidos en suelos y materia en descomposición (Magnani *et al.* 2010). *Cellulosimicrobium* una bacteria Gram-negativo que fue clasificada por primera vez como *Cellulomonas*. *Cellulosimicrobium* ha sido aislado desde el contenido gútural de algunas terminas en Australia, hasta en suelos de humus (Magnani *et al.* 2010). *Acinetobacter* son bacterias Gram-negativo de forma de coco-bacilo que se distribuyen ampliamente en la naturaleza. Son importantes en el suelo y contribuyen a su mineralización (Magnani *et al.* 2010). Por último, *Leucobacter* es una bacteria Gram-positivo aeróbica y de forma de bacilos. De este género existe muy escasa información (Magnani *et al.* 2010). Lo anterior muestra, la capacidad colonizadora de dichos géneros de bacteria. Al ser tan exitosos creciendo en gran variedad de ecosistemas (y microecosistemas), no es de extrañarse que aún luego de las desinfecciones con cloro y etanol del tejido vegetal, haya quedado suficientes bacterias, que al ser cultivadas en medio NA, haya crecido a tal punto que hayan inhibido el crecimiento de *Cmm*, y a la vez, hayan sido detectadas en este estudio.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede observar que las principales bacterias aisladas de las semillas de tomate son bacterias del suelo y endofitas. Esto descarta el hecho de que haya habido contaminación indeseada en el laboratorio donde se hizo este estudio, ya que, de haber sido así, bacterias ausentes en suelo, y más comunes en la piel humana hubieran crecido en los medios de cultivo en vez de las bacterias mencionadas. Por otra parte, casi todas las bacterias obtenidas presentan una forma bastante parecida a *C.michiganensis* subsp. *michiganensis*, lo que añade dificultad al aislamiento de esta última bacteria. Esto conlleva al pensar, de que la semilla certificada que es vendida a los agricultores como libre de cualquier patógeno, no está libre de posibles patógenos y otras bacterias del suelo; como por ejemplo, *Pseudomonas* y *Pantoea* son patógenos vegetales, causando la primera marchitez en tomate. Esto puede explicar porqué las muestras de tomate pueden presentar síntomas similares a infección por *Cmm* (como en el caso de infección por *Pseudomonas*), confundiendo el diagnóstico de la enfermedad. De ser esto verdad, se requiere de un monitoreo mucho más riguroso en el procesos de certificación de las semillas, así como una modificación en la metodología seguida para cumplir los objetivos de la certificación ya que ésta, de ser este el caso, no se está llevando a cabo con éxito.

Debido a que las bacterias obtenidas poseen una tasa de crecimiento más rápida que *Cmm*, la misma temperatura de crecimiento óptima (24°C - 28°C) y que el medio de cultivo utilizado es general (no semi-selectivo ni mucho menos selectivo), es posible que el crecimiento y requerimiento de alimento y espacio de dichas bacterias haya suprimo el crecimiento de *Cmm*. Si alguna vez se tuvo *Cmm* en las muestras estudiadas, probablemente en alguna resiembra se confundió con alguna de las bacterias resultantes. Por otra parte, si *Cmm* convivió con alguna de las bacterias resultantes, es muy posible que haya resultado en la inhibición de su crecimiento (por tasa lenta de crecimiento) permitiendo así, que las bacterias obtenidas como resultado final hayan ocupado su lugar. Por otro lado, en el tema bioinformático (ya que pudo haber un error en el BLAST) se realizó en CLC Viewer 5.0, un alineamiento de las secuencias ARNr 16S consenso de las muestras con respecto a ellas mismas, a un grupo de secuencias de referencia de distintas cepas de *Cmm* encontradas en NCBI (VT3, VT13, VT14, VT15 y BC2643) y a muestras aisladas anteriormente en el laboratorio por el Lic. Henry Canastuj (HC001-HC010;

Canastuj 2011), para mayor rigurosidad y para doble comprobación de resultados. Luego del alineamiento se realizó un árbol de agrupamiento de secuencias parecidas siguiendo el método de Neighbor Joining (NJ) dado en el programa, para determinar qué tan similares eran las secuencias de las muestras con respecto a *Cmm*. En la Figura No. 10 (ver Resultados) se puede observar el resultado de este análisis. Como era de esperarse, el NJ agrupa a las secuencias de todas las cepas referencia de *Cmm* en un mismo grupo, indicando mayor semejanza entre sus secuencias. Del mismo modo, las muestras identificadas por el Lic. Henry Canastuj (Canastuj 2011) como *Cmm* se agrupan muy cercanamente entre ellas y bastante cercanas a las *Cmm* de referencia (NCBI). Sin embargo, ninguna de las muestras se agrupan cerca de las referencias o las de Canastuj, indicando gran disimilitud entre *Cmm*, las muestras de Canastuj y las muestras obtenidas en este estudio.

Para la determinación de la presencia o ausencia de pCM1 y pCM2, una vez obtenido el ADN a una dilución de 1/100 (de la primera parte de la sección anterior), también se intentó amplificar con Cm3/4 y Cm5/6. Para ambos casos, solamente los controles amplificaron, ya sea porque las muestras no eran *Cmm* o porque carecían de los plásmidos (Ver Figura 22 en Apéndice y Figura 15 en Resultados). Adicionalmente a las pruebas de amplificación de la región ARNr 16S utilizando el ADN extraído con el kit, también se intentó amplificar las regiones plasmidiales con los cebadores Cm3/Cm4 y Cm5/Cm6, utilizando la dilución 1/500. A pesar de ello, como se puede ver en la Figura 23, ninguno resultó exitoso. A este punto, empezaron los problemas con el control positivo, ya que el utilizado en las muestras (que si amplificó para Cm3/Cm4) no mostraba una clara amplificación para Cm5/Cm6. Como control se utilizó la muestra 495. Ésta producía una banda muy tenue con Cm5/Cm6, apenas perceptible. También examinó el método de extracción dirigido a plásmidos para determinar si así, podría detectarse pCM1 o pCM2. Esto no resultó, ya que para Cm3/Cm4, solo el control amplificó; y para Cm5/Cm6, ni siquiera el control amplificó (Ver Figura 26, 27 y 28 en Apéndice). Esto fue un problema ya que se intentó diferentes controles y diferentes diluciones del control positivo y ninguna prueba salía consistente, es decir, a veces amplificaba el producto deseado y a veces no. Durante esta tesis, también se llevó a cabo diferentes pruebas de controles, siendo el más consistente, el denominado C(+) 210t (1/4). Este control es la muestra 210t y dilución a 1/4.

Éste si amplificó bien y la banda obtenida fue intensa, indicando que había suficiente producto de PCR, y que se puede utilizar para comparación de muestras y determinación de presencia y ausencia como control positivo.

Por otro lado, es probable que sí se haya aislado en algún momento del estudio, *Cmm*. Se cree, como se mencionó con anterioridad, que la muestra MA haya sido *Cmm*, ya que se obtuvo una amplificación del producto de PCR utilizando Cm3/Cm4 y Cm5/Cm6; sin embargo, debido a falta de cebadores 27F y 1492R (al momento de la amplificación de plásmidos), lamentablemente no se pudo hacer la identificación utilizando ARNr 16S. Por ello, solo se puede decir que pCM1 y pCM2 estaban presentes en esa cepa, pero se desconoce si era *Cmm*. Luego de varios meses, la muestra ya no amplificó para ninguno de los cebadores dirigidos a pCM1 y pCM2, lo que lleva a pensar que ocurrió pérdida del plásmido, o alguna de las bacterias resultantes inhibió su crecimiento. Como se mencionó anteriormente, ninguna bacteria obtenida era *Cmm*, lo que explica perfectamente por qué ninguna amplificación con Cm3/Cm4 y Cm5/Cm6 resultó exitosa. Finalmente, para el tiempo en que se hizo la tesis, se obtuvo resultados interesantes, ya que se determinó que método de extracción funciona mejor para bacterias Gram-positivo y se observó que amplificación del 16S ARNr es útil para una identificación rápida y confiable de bacterias, sin embargo, no se pudo descartar la hipótesis nula, ya que de hecho, ninguna bacteria resultó ser *Cmm*, apoyando la hipótesis nula planteada en este estudio. Es probable que se pueda encontrar problemas en identificación cuando se intenta determinar subespecies mediante análisis del 16S ARNr debido a su alta similitud. Es una lástima que al momento de la amplificación de los plásmidos no haya habido reactivos para amplificación y secuenciación del 16S ARNr para comprobar la especie de la bacteria analizada y así, determinar si lo que hubo fue pérdida de plásmidos o pérdida de la bacteria.

V. CONCLUSIONES

- Con los resultados de este estudio se puede concluir que la hipótesis nula es rechazada, es decir, ninguna de las colonias analizadas fue identificada como *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.
- Debido a que son bacterias difíciles de manipular y a no tener los reactivos necesarios ni la experiencia necesaria, aislar bacterias Gram-positivo fue difícil, y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* no se pudo aislar.
- En las muestras analizadas en este estudio, se encontraron diferentes especies de bacterias presentes en las semillas de tomate. Dichas bacterias pertenecen a los géneros *Curtobacterium*, *Bacillus*, *Staphilococcus*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Strenotrophomonas*, *Cellulomonas*, *Cellulosimicrobium*, *Acinetobacter* y *Leucobacter*.
- Los cebadores 27F y 1492R, para amplificar ARNr 16S, probaron ser una herramienta útil, rápida y accesible para la identificación de las colonias, sin embargo, hasta qué punto sigue siendo útil para discernir entre subespecies, sigue siendo tema de debate.
- *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* fue aislada en el laboratorio donde este estudio se llevó a cabo, sin embargo, probablemente a bacterias antagonistas o debido a resiembra excesiva, es probable que su crecimiento haya sido inhibido o que sus plásmidos se hayan perdido. .
- La morfología de las bacterias antagonistas puede ser muy similar a las de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* lo que pudo terminar en una confusión a la hora de aislamiento. La temperatura óptima de muchas de las bacterias antagonistas

- es similar a la de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, la cual debido a su baja tasa de crecimiento en el medio utilizado y su baja velocidad de crecimiento, se pudo ver inhibida.
- Las bacterias antagonistas a *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* encontradas en este estudio, son bacterias principalmente endófitas y de suelo, lo que indica que probablemente la certificación de semilla no se esté haciendo bien.
- Los cebadores Cm3/Cm4, así como Cm5/Cm6 utilizados para el diagnóstico de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* funcionan para pruebas directamente de tejido vegetal, sin embargo, con colonias aisladas no tuvo mucha utilidad.
- Debido a la naturaleza de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, se concluye que los métodos de identificación son muy inespecíficos, por lo que fue muy difícil identificarla. Adicionalmente, los métodos establecidos y utilizados en este estudio no son buenos para poder realizar el aislamiento diferenciado de *Cmm* con respecto a bacterias de suelo y endófitas.
- La descripción morfológica de la bacteria, sumada al aislamiento en medios selectivos y las pruebas de Gram, deben ser considerados un complemento al diagnóstico molecular y no, una alternativa.

VI. RECOMENDACIONES

Se recomienda intentar el aislamiento con medios selectivos específicos para *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. Una vez realizado esto, el diagnóstico molecular será más sencillo y rápido. Se recomienda mejorar el registro de las muestras entrantes y el control de rotulación en el laboratorio, ya que una confusión en cuanto identidad de la bacteria y proveniencia de la misma, puede resultar en un grave y erróneo diagnóstico, afectando así al cliente y a los agricultores que solicitan dicho diagnóstico. Esto terminaría en una toma equivocada de decisión por parte del solicitante. Se recomienda también, no realizar los diagnósticos directamente de la semilla, ya que se ha reportado que en semilla existen almidones que pueden inhibir las pruebas moleculares, y además, como se observó en este estudio, puede haber presencia de bacterias antagonistas que pueden evitar el aislamiento de *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Se recomienda también, no trabajar con tanta muestra hasta que no se haya estandarizado un protocolo, ya que esto resulta en la equivocación de muestras, pérdida de material, uso excesivo de material y desperdicio de los mismos, así como en la resiembra excesiva de las colonias aisladas. Es recomendable encontrar marcadores moleculares dirigidos al genoma de *C. michiganensis subsp michiganensis*, ya que esto evitaría un falso positivo debido a pérdida de plásmidos por resiembra excesiva. Por otro lado, se recomienda no presentar un diagnóstico positivo o negativo basado únicamente en la prueba molecular o microbiológica, sino de una integración de ambas. Finalmente, la aplicación de nueva tecnología (como PCR en tiempo real o qPCR) podría permitir estudios enfocados desde un punto de vista diferente (como por ejemplo cuantificación y determinación de perfiles de expresión genética) que pueden combinarse con métodos microbiológicos selectivos para la obtención de resultados más robustos, rápidos y congruentes

VII. LITERATURA CITADA

- Álvarez, L. 2011. *ANAPI reclama a Monsanto por semilla contaminada*. [El Periódico], [Guatemala]. En: <http://www.elperiodico.com.gt/es/20110126/economia/189559/> [con acceso el 04 de Abril 2011].
- Amann, R.; W. Ludwig y K. Schleifer. 1995. *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. *Microbiology Review* 59:143-169.
- Anónimo. 2011. *La ANAPI entablará demanda por daños*. Prensa Libre [Guatemala]. En: http://www.prensalibre.com/economia/Anapi-entablara-demanda-danos_0_440955914.html. [con acceso el 04 Abril 2011].
- Anónimo. 2011a. *Productores de tomate reclaman indemnización en Guatemala*. El Economista [España]. En: <http://m.economista.net/2011/01/26/productores-de-tomate-reclaman-indemnizacion-en-guatemala/>. [con acceso el 04 de Abril 2011].
- Anónimo. 2011b. *Se pierden Cultivos en Guatemala*. El Heraldo [Honduras]. En: <http://www.elheraldo.hn/Ediciones/2011/02/03/Noticias/Se-pierden-cultivos-de-tomate-en-Guatemala>. [con acceso el 04 de Abril 2011].
- Antoniou, P.; E. Tjamos y C. Pnangopoulos. 1995. *Use of solarization for controlling bacterial canker of tomato in plastic houses in Greece*. *Plant Pathology* 44:438-447.
- ASTA. 2009. *Bacterial Canker of Tomato: A commercial Growers Guide*. The Ohio State University [Estados Unidos]. 6 pp.

- Ayala, L.; R. Rodríguez, C. Aguilar, F. Victoriano y A. Quero. 2004. *Detección de Clavibacter michiganensis subsp. nebraskensis (Schuster, Hoff, Mandel y Lazar) Vidaver y Mandel, usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa*. Revista Mexicana de Fitopatología 22(002):239-245.
- Baer, D. y N. Gudmestad. 1995. *In vitro cellulolytic activity of the plant pathogen Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*. Canadian Journal of Microbiology 41:877-888.
- Benhamou, N. 1991. *Cell surface interactions between tomato and Clavibacter michiganense subsp. michiganense: Localization of some glycoproteins in infected host leaf tissues*. Physiology and Molecular Plant Pathology 38:15-38.
- Bermpohl, A.; J. Dreier, R. Bahro y R. Eichenlaub. 1996. *Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis with tomato plants*. Microbiological Research 151:391-399.
- Biddle, J.; D. McGee y E. Braun. 1990. *Seed transmission of Clavibacter michiganense subsp. nebraskense in corn*. Plant Disease 74:908-911.
- Bolaños, R. 2010a. *Bacteria causa pérdidas en tomate de exportación*. Prensa Libre [Guatemala]. En: http://173.204.12.99/economia/Bacteria-causa-perdidas-tomate-exportacion_0_335366465.html. [con acceso el 03 de Abril 2011].
- Bolaños, R. 2010b. *Difieren por origen de la bacteria del tomate*. Prensa Libre [Guatemala]. En: http://173.204.12.99/economia/Difieren-origen-bacteria-tomate_0_339566044.html [con acceso el 03 de Abril 2011].

- Bolaños, R. 2010c. *MAGA revisa cultivos de tomate infectados*. Prensa Libre [Guatemala]. En: http://173.204.12.99/economia/Maga-revisa-cultivos-tomate-infectados_0_341965815.html. [con acceso el 03 de Abril 2011].
- Bolaños, R. 2011a. *El MAGA no reconoce que hay semilla contaminada*. Prensa Libre [Guatemala]. En: http://173.204.12.99/economia/Maga-reconoce-semilla-contaminada_0_416358366.html. [con acceso el 04 de Abril 2011].
- Bolaños, R. 2011b. *Polémica en caso de tomate*. Prensa Libre [Guatemala]. En: http://173.204.12.99/economia/Polemica-caso-tomate_0_416958313.html. [con acceso el 04 de Abril 2011].
- Canastuj, H. 2011. *Evaluación y caracterización de bacterias presuntamente *Clavibacter 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 de Licenciatura, Departamento de Bioquímica y Microbiología, Universidad del Valle de Guatemala. 84pp.
- Case, R.; Y. Boucher, I. Dahllöf, C. Holmström, W. Doolittle y S. Kjelleberg. 2007. *Use of 16S rRNA and rpoB genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies*. Applied and Environmental Microbiology: 278-288.
- Carroll, R. y F. Lukezic. 1971. *Preservation of *Corynebacterium insidiosum* in a sterile soil mix without loss of virulence*. Phytopathology 61:688-690.
- Ciancio, A. y K. Mukerji. 2010. *Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria*. 1era Edición. Springer, Estados Unidos. 422pp.

- De Boer, S. y A. Wiczorek. 1984. *Production of monoclonal antibodies to Corynebacterium sepedonicum*. *Phytopathology*74:1431-1434.
- De Boer, S.; D. Stead, A. Alivizatos, J. Janse, J. van Vaerenbergh, T. De Haan y J. Mawhinney. 1994. *Evaluation of serological tests for detection of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus in composite potato stem and tuber samples*. *Plant Disease*78:725-729.
- De la Isla, L. 1994. *Fitopatología*. Editorial LIMUSA, S.A., México. 384pp.
- Dreier, J.; A. Bermpohl y R. Eichenlaub. 1995. *Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. *Phytopathology*85:432-468.
- Dreier, J.; D. Meletzus y R. Eichenlaub. 1997. *Characterization of the Plasmid Encoded Virulence Region pat-1 of Phytopathogenic Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*10(2):195-206.
- Eppo. 2006. *Datasheets on quarantine pests: Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.
En http://www.eppo.org/QUARANTINE/bacteria/Clavibacter_m_michiganensis/CORBMI_ds.pdf [con acceso el 23 de Enero del 2011].
- Fatmi, M. y N. Schaad. 1988. *Semiselective agar medium for isolation of Clavibacter michiganense subsp. michiganense from tomato seed*. *Phytopathology*78:121-126.
- Fatmi, M. y N. Schaad. 2002. *Survival of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco*. *Plant Pathology*51:149-154.

- Fessehaie, A.; S. De Boer y C. Levesque. 2002. *New diagnostic assay based on DNA array for identification and detection of five bacterial pathogens of potato*. *Phytopathology*92:S25.
- Firrao, G. y R. Locci. 1994. *Identification of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus using polymerase chain reaction*. *Canadian Journal of Microbiology*40:148-151.
- Frank, G. 1999. *Persistence and latency of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus in field grown seed potatoes*. *Plant Disease*83:247 – 250.
- Frank, J.; C. Reich, S. Sharma, J. Weisbaum, B. Wilson y G. Olsen. 2008. *Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes*. *Applied and Environmental Microbiology*: 2461-2470.
- Franken, A.; G. Kamminga, W. Snyders, P. van der Zouwen y Y. Birnbaum. 1993. *Detection of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis in tomato seeds by immunofluorescence microscopy and dilution plating*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*99:125-137.
- Fulkerson, J. 1960. *Pathogenicity and stability of strains of Corynebacterium insidiosum*. *Phytopathology*50:377-380.
- Gamard, P. y S. De Boer. 1995. *Evaluation of antagonistic bacteria for suppression of bacterial ring rot of potato*. *European Journal of Plant Pathology* 101:519-525.
- Gitaitis, R. 1990. *Induction of a hypersensitive-like reaction in four-o'clock by Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*. *Plant Disease*74:834-838.
- Gnanamanickam, S. (Ed.). 2006. *Plant-Associated Bacteria*. Primera Edición. Springer, Estados Unidos. 712pp.

- Gobierno de Aragón. 2010. *Biodiversidad agroambiental de Aragón: Clavibactermichiganensis subsp. michiganensis*. En: <http://prediversidadagroambiental.aragon.es/index.php/mod.especies/mem.detalle/id.3120/chk.83cdf50bdb3a096438e929ff106b19ca>. [con acceso el 12 de Febrero del 2011].
- Gross, D.; A. Vidaver y M. Keralis. 1979. *Bacteriocins of phytopathogenic Corynebacterium species*. Canadian Journal of Microbiology 25:367-374.
- Gross, D. y A. Vidaver. 1979. *Indigenous plasmids from phytopathogenic Corynebacterium species*. Journal of General Microbiology 115:479-489.
- Hausbeck, M.; J. Bell, C. Medina-Mora, R. Podolsky y D. Fulbright. 2000. *Effect of bactericides on population sizes and spread of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field*. Phytopathology 90:38-44.
- Henson, J. y R. French. 1993. *The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis*. Annual review of Phytopathology 31:81-109.
- Hogenhout, S. y R. Loria. 2008. *Virulence mechanisms of Gram positive plant pathogenic bacteria*. Elsevier, Current Opinion in Plant Biology 11:449 – 456.
- Hunt, O.; G. Griffin, J. Murray, M. Pedersen y R. Peaden. 1971. *The effects of root knot nematodes on bacterial wilt in alfalfa*. Phytopathology 61: 256-259.
- Jacobs, J.; T. Carroll y G. Sundin. 2005. *The role of pigmentation, ultraviolet radiation tolerance, and leaf colonization strategies in the epiphytic survival of phyllosphere bacteria*. Microbial Ecology 49:104-113.

- Jahr, H.; R. Bahro, A. Burger, J. Ahlemeyer y R. Eichenlaub. 1999. *Interactions between Clavibacter michiganensis and its host plants*. Environmental Microbiology 1(2):113-118.
- Jahr, H.; J. Dreier, D. Meletzus, R. Bahro y R Eichenlaub. 2000. *The Endo- β -1,4-gluconase CelA of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis is a pathogenicity determinante required for induction of bacterial wilt of tomato*. Molecular Plant-Microbe Interactions 13(7):703-714.
- Kaneshiro, W.; C. Mizumoto y A. Álvarez. 2006. *Differentiation of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing*. European Journal of Plant Pathology 116:45-56.
- Kim, M.; Y. Kim, H. Kim, S. Kim, T. Yi y D. Yang. 2008. *Curtobacterium ginsengisoli sp. nov. isolated from soil of a ginseng field*. International Journey of Systematic and Evolutionary Microbiology 58:2393-2397.
- Laurila, J.; M. Metzler, C. Ishimaru y V. Rokka. 2003. *Infection of plant material derived from Solanum acaule with Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus: temperature as a determining factor of immunity of S. acaule to bacterial ring rot*. Plant Pathology 52:496-504.
- Le Borgne, S. 2005. *Marcadores Filogenéticos Alternativos al gene 16S rDNA en estudios de Diversidad Bacteriana*. México. XI Congreso nacional de la Biotecnología y Bioingeniería. En:
<http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/merida05/TRABAJOS/magistrales/M-6.pdf> [con acceso el 05 de Mayo 2011].
- Lee, I.; I. Bartoszyk, D. Gundersen, B. Mogen y R. Davis. 1997. *Nested PCR for ultrasensitive detection of the potato ring rot bacterium, Clavibacter michiganensis subsp sepedonicus*. Applied and Environmental Microbiology 63:625-2630.

- Lee, I.; I. Bartoszyk, D. Gundersen-Rindal, y 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 63:631-2636.
- Magnani, G.; C. Didonet, L. Cruz, C. Picheth, F. Pedrosa y E. Souza. 2010. *Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane*. Genetics and Molecular Research 9(1):250-258.
- Maldonado, J. 2011a. *Piden Indemnización por Q25 millones*. Siglo 21 [Guatemala]. En: <http://www.s21.com.gt/node/28389>. [con acceso el 03 Abril 2011].
- Maldonado, J. 2011b. *Monsanto: Semillas no contaminadas*. Siglo 21 [Guatemala]. En: <http://www.s21.com.gt/node/28563>. [con acceso el 04 de Abril 2011].
- Maldonado J. 2011c. *UE apoyará laboratorios del MAGA*. Siglo 21 [Guatemala]. En: <http://www.s21.com.gt/nacionales/2011/02/14/ue-apoyara-laboratorios-maga>. [con acceso el 04 Abril 2011].
- Marte, M. 1980. *Alcuni aspetti istologici e istochimice dell'infezione da Corynebacterium michiganense nel fusto del pomodoro*. Phytopathology Z 97:52 – 271.
- Medrano, E. y A. Bell. 2007. *Role of Pantoea agglomerans in opportunistic bacterial seed and boll rot of cotton (Gossypium hirsutum) grown in the field*. Journal of Applied Microbiology 102:34-143.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA). 2008. *Acuerdo Ministerial No. 813-2007*. Oficina de Normas y Procedimientos, Unidad de normas y Regulaciones [Guatemala]. 8 pp [con acceso el 31 de Marzo 2011]

- Nemeth, J.; E. Laszlo y L. Emody. 1991. *Clavibacter michiganensis subsp. insidiosus* in *Lucerne seeds*. Bull. OEPP21:713-718.
- O'Hara, C.; F. Tenover y J. Miller. 1993. *Parallel comparison of accuracy of API 20E, Vitek GNI, MicroScan Walk/Away Rapid ID, and Becton Dickinson Cobas Micro ID-E/NF for identification of members of the family Enterobacteriaceae and common gram-negative, non-glucose-fermenting bacilli*. Journal of Clinical Microbiol31:3165-3169.
- Ortiz, A. 2011. *Asocian a semilla bacteria de tomate*. Prensa Libre [Guatemala]. En:http://www.prensalibre.com/economia/Asocian-semilla-bacteria-tomate_0_600539946.html. [con acceso el 04 abril 2011].
- Pashke, M. y N. van Alfen. 1993. *Extracellular polysaccharide impaired mutants of Clavibacter michiganense subsp. insidiosum*. Physiology Molecular Plant Pathology42:309 – 319.
- Pommerville, J. 2004. *Alcama's Fundamentals of Microbiology*. Séptima Edición. Jones & Bartlett, Estados Unidos. 1120 pp.
- Productores de Semillas. 2006. *Plagas y Enfermedades del Tomate: Guía de Identificación y Manejo*. Estados Unidos. Productores de Hortalizas. 50 pp.
- Rai, P. y G. Strobel. 1969. *Phytotoxic glycopeptides produced by Corynebacterium michiganense II. Biological Properties*. Phytopathology59:53 – 57.
- Rasche, F.; R. Trondl, C. Nagreiter y T. Reichenauer . 2006. *Chilling and cultivar type affect the diversity of bacterial endophytes colonizing sweet pepper (Capsicum annum L.)*. Canadian Journal of Microbiology52:1036-1045.

- Relman, D. 1998. *Detection and identification of previously unrecognized microbial pathogens*. Emerging Infectious Diseases Journal4:382-389.
- Rodicio, M. y M. Mendoza. 2004. *Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica22(4):238-245.
- Santos, M.; L. Cruz, P. Norskov y O. Rasmussen. 1997. *A rapid and sensitive detection of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis in tomato seeds by Polymerase Chain Reaction*. Seed Science and Technology25:581-584.
- Sauka, D. y G. Benintende. 2008. *Bacillus thuringiensis: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas*. Revista Argentina de Microbiología 40(2):124-140.
- Schneider, B.; J. Zhao y C. Orser. 1993. *Detection of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus by DNA amplification*. FEMS Microbiology Lett109:207-212.
- Schuster, M.; B. Hoff y W. Compton. 1975. *Variation, maintenance, loss and failure to recover virulence in Corynebacterium nebraskense*. Plant Disease Reporter59:101-105.
- Seebold, K. 2008. *Plant Pathology Fact Sheet: Bacterial Canker of Tomato*. University of Kentucky, College of Agronomy: Cooperative Extension Service. Estados Unidos. 4 pp.
- Slack, S.; J. Drenna, A. Westra, N. Gudmestad y A. Oleson. 1996. *Comparison of PCR, ELISA and DNA hybridization for the detection of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus in field-grown potatoes*. Plant Disease80:519-524.


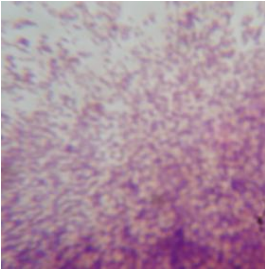
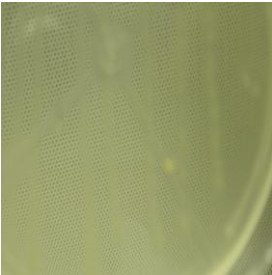
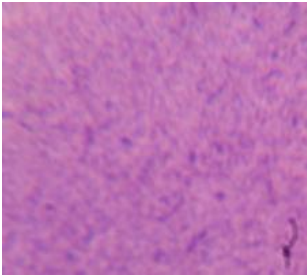
- Shirakawa, T. y T. Sasaki. 1988. *A selective medium for isolation of Corynebacterium michiganense subsp. Michiganense, the pathogen of tomato bacterial canker disease.* Annals of the Phytopathological Society of Japan 54:540-543.
- Shlevin, E.; Y. Mahrer, G. Kritzman y J. Katan. 2004. *Survival of plant pathogens under structural solarization.* Phytoparasitica 32:470-478.
- Slonczewski, J. y J. Foster. 2010. *Microbiology: An Evolving Science.* Segunda Edición. W.W. Norton & Company, Estados Unidos. 1097 pp.
- Smidt, M. y A. Vidaver. 1987. *Variation among strains of Clavibacter michiganense subsp. nebraskense isolated from a single popcorn field.* Phytopathology 77:388-392.
- Smith, N.; J. Hennessy y D. Stead. 2001. *Repetitive sequence-derived PCR profiling using the BOX-AIR primer for rapid identification of the plant pathogen Clavibacter michiganensis susp. sepedonicus.* European Journal of Plant Pathology 107:739-748.
- Soylu, S.; O. Baysal y E. Soylu. 2003. *Induction of disease resistance by the plant activator, acibencolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis) in tomato seedlings.* Plant Science 165:1069-1075.
- Stackebrandt, E. y B. Goebel. 1994. *Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology.* International Journal of Systematic Bacteriology 44:846-849.
- Strider, D. 1969. *Bacterial Canker of Tomato caused by Corynebacterium michiganense. A literature review and bibliography.* North Carolina Agric. Exp. Stn. Tech Bull, Estados Unidos. 193 pp.

- Strobel, G. 1970. *A phytotoxic glycopeptides from potato plants infected with Corynebacterium sepedonicum*. Journal of Biological Chemistry 245:32-38.
- Talaro, K. 2008. *Foundations in Microbiology*. Séptima edición. McGraw-Hill Science, Estados Unidos. 928 pp.
- Tanner, M.; W. Coleman, C. Everett, S. Robles, M. Dilworth, M. Yang y D. Youvan. 2000. *Multispectral Bacterial Identification*. The Smithsonian/NASA Astrophysics Data System Biotechnology et alia, Estados Unidos 6:1-9
- Thiel, T. 1999. *Science in the Real World, Microbes in Action: Introduction to Bacteria*. University of Missouri, St. Louis. Estados Unidos. 9 pp.
- Thyr, B. 1969. *Assaying tomato seed for Corynebacterium michiganensis*. Plant Disease Report 5:858-860.
- Tsiantos, J. 1987. *Transmission of the bacterium Corynebacterium michiganense subsp. michiganense by seeds*. Journal of Phytopathology 119:142-146.
- Uthkhede, R. y C. Koch. 2004. *Biological treatments to control bacterial canker of green house tomatoes*. Biocontrol 49:305-313.
- Van Alfen, N.; B. McMillan y Y. Wang. 1987. *Properties of the extracellular polysaccharide of Clavibacter michiganense subsp. insidiosum that may affect pathogenesis*. Phytopathology 77:501-505.
- Van Bekhoven, J.; D. Stead y J. van der Wolf. 2002. *Detection of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus by AmpliDet RNA, a new technology based on real time monitoring of NASBA amplicons with a molecular beacon*. Journal of Applied Microbiology 93:840-849.


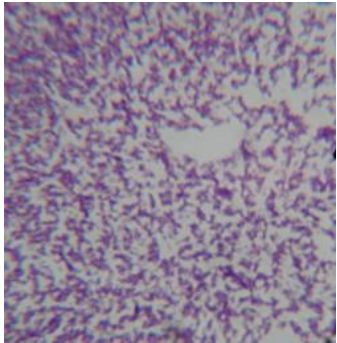
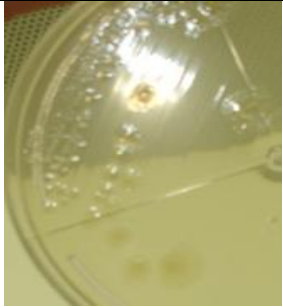
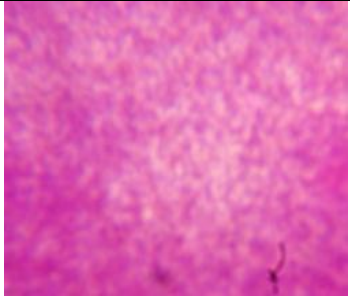
- Van der Wolf, J. y J. Van Beckhoven. 2004. *Factors affecting survival of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus in water*. Journal of Phytopathology 152:161-168.
- Van Steekelenburg, N. 1985. *Resistance to Corynebacterium michiganense in tomato genotypes*. Euphytica 34:245-250
- Van Vaerenbergh, J. y J. Chauveau. 1987. *Detection of Corynebacterium michiganense in tomato seed lots*. Bulletin OEPP/EPPO 17:131-138.
- Vidaver, A. 1977. *Maintenance of viability and virulence of Corynebacterium nebraskense*. Phytopathology 67:825-827.
- Werener, N.; D. Fullbright, R. Podolsky, J. Bell y M. Hausbeek. 2002. *Limiting populations and spread of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis on seedling tomatoes in the greenhouse*. Plant Disease 86:535-542.
- Westra, A. y S. Slack. 1992. *Isolation and characterization of extracellular polysaccharide of Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus*. Phytopathology 82:1193-1199.
- Wild, A. 1992. *Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell*. 1era Edición. Editorial Mundi-Prensa, España. 1045pp.

VIII. ANEXO


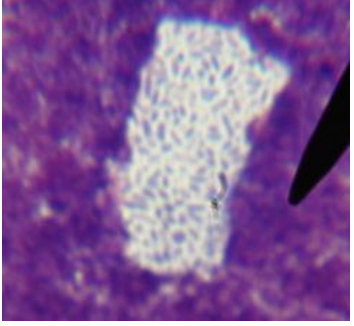

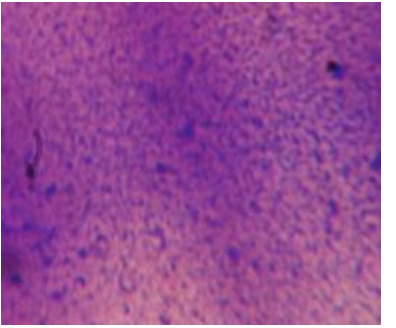
Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y amplificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Este cuadro presenta las fotos de las colonias de las muestras trabajadas y el resultado de la tinción Gram (y forma de la bacteria). También se presenta un (-) para amplificación ausentes para un set de cebadores específico y (+) para amplificación presente para un set de cebadores específicos. Finalmente, (+) indica presencia de bacteria en semillas y gram-positivo, (-) indica lo contrario.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS001	27853 cortA	(+)	(+)	Bacilos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color blanco	(-)	(-)	(+)		
PS002	27137 cortAB	(+)	(+)	Bacilos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color blanco. Bacilos cortos	(-)	(-)	(+)		

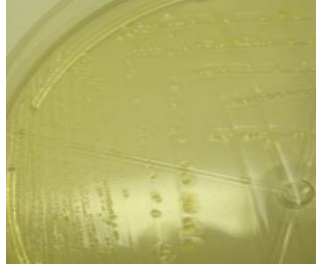
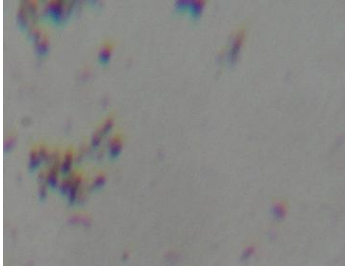
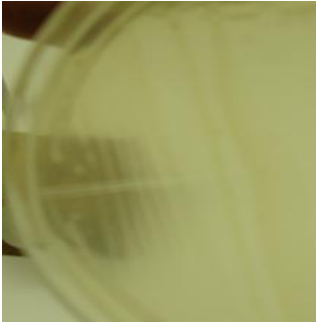
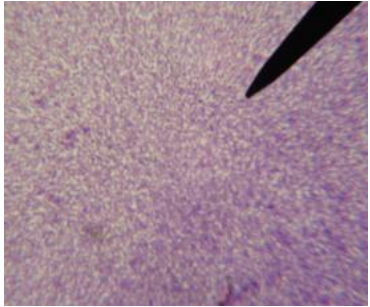
Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y amplificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Continuación.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS003	27976 cortA	(-)	(+)	Bacilos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color amarillo verduzco	(-)	(-)	(+)		
PS004	27850 cortBB	(+)	(+)	Bacilos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color blancuzco/transparente	(-)	(-)	(+)		

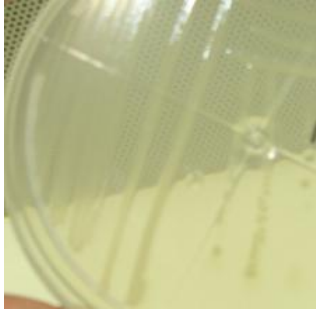
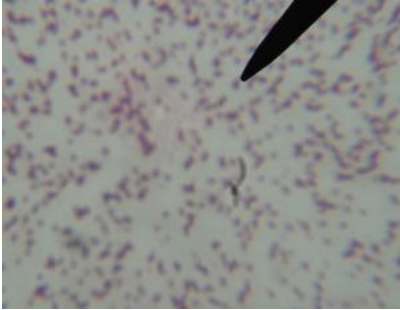

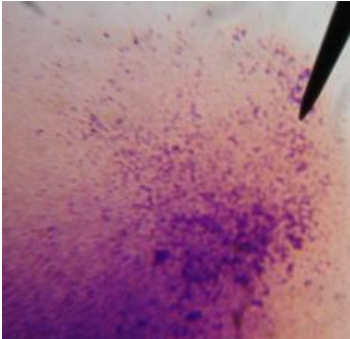
Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y amplificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Continuación.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS005	27850 entA	(+)	(+)	Bacilos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color blancuzco/transparente Bacilos bien definidos	(-)	(-)	(+)		
PS006	27137 cortAA	(+)	(+)	Bacilos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color blanco Bacilos Cortos	(-)	(-)	(+)		


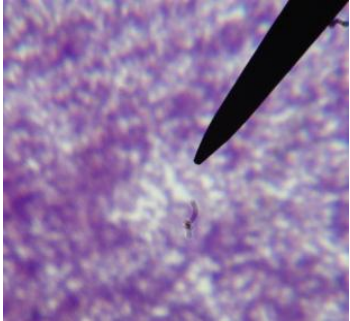

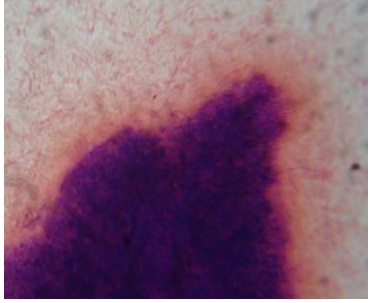
Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y ampliificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Continuación.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS007	27855 cortA	(+)	(+)	Bacilos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color blancuzco/transparente	(-)	(-)	(+)		
PS008	27849 cortA	(+)	(+)	Cocos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color blanco	(-)	(-)	(+)		


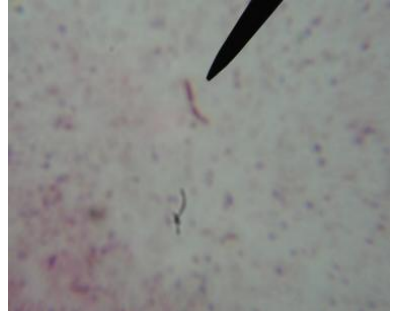
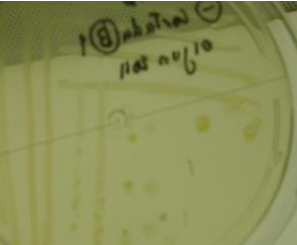
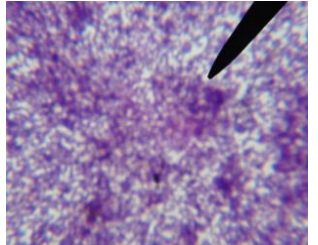
Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y amplificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Continuación.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS009	27853 ent	(+)	(+)	Bacilos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color blanco Bacilos cortos	(-)	(-)	(+)		
PS010	27855 ent	(+)	(+)	Bacilos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color blanco	(-)	(-)	(+)		

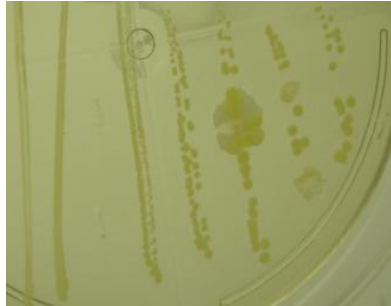
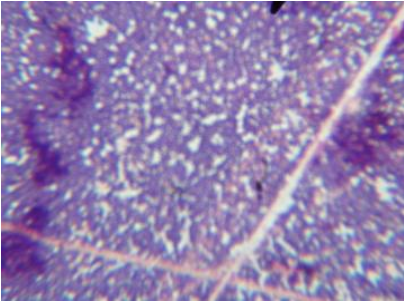

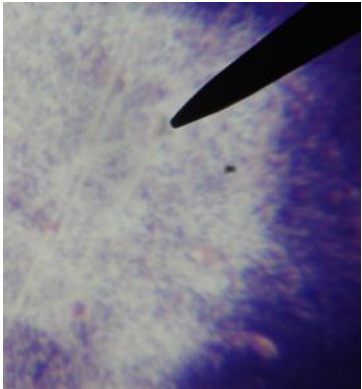
Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y ampliificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Continuación.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS011	27976 cortB2	(-)	(+)	Bacilos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color amarillo verdusco	(-)	(-)	(+)		
PS012	27850 cortAB	(+)	(+)	Bacilos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color blancuzca/transparente	(-)	(-)	(+)		


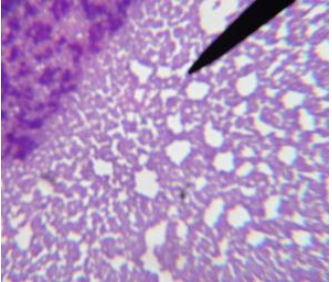

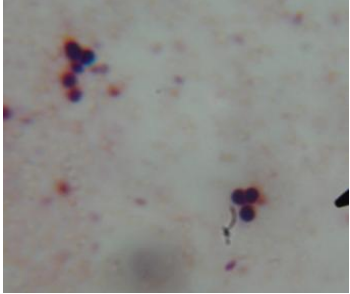
Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y amplificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Continuación.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS013	27853 cortC	(+)	(+)	Bacilos	Colonia no tan bien delimitada, medio opaca, color blanco Bacilos grandes	(-)	(-)	(+)		
PS014	27976 cortB1	(-)	(+)	Bacilos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color amarillo verduzco Bacilos grandes	(-)	(-)	(+)		

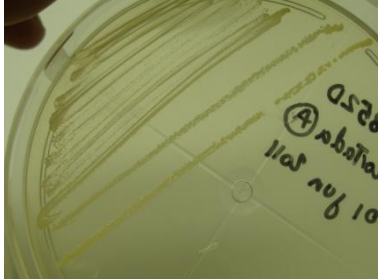
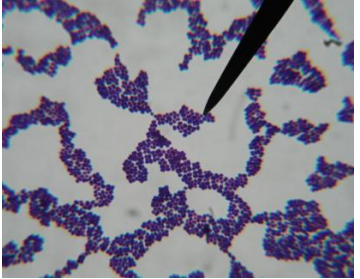

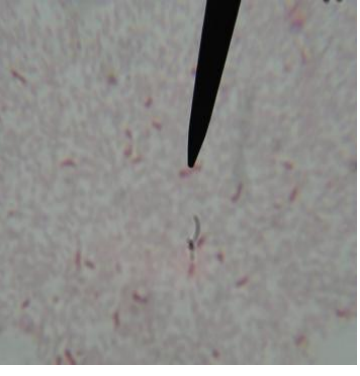
Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y amplificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Continuación.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS015	27850 entB	(+)	(+)	Bacilos	<p>Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color amarillo verdusco</p> <p>Bacilos cortos, parecen cocos</p>	(-)	(-)	(+)		
PS016	27137 entA	(+)	(+)	Cocos ó Bacilos	<p>Colonia no bien delimitada, brillante, color blanco/transparente</p> <p>Muy cortos que no se define bien la forma</p>	(-)	(-)	(+)		


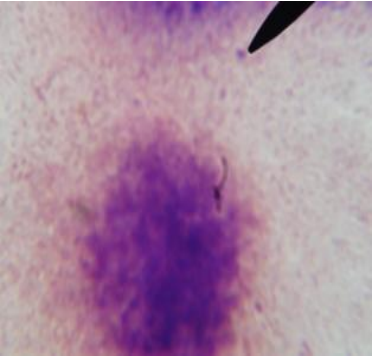
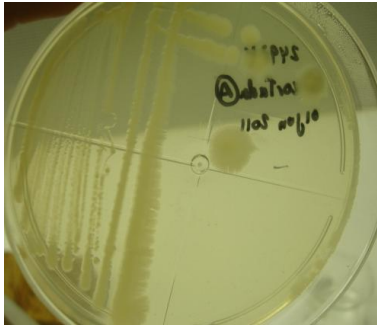
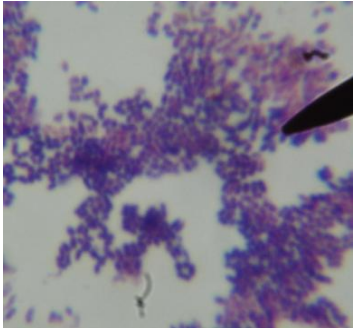
Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y amplificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Continuación.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS018	27853 cortB	(+)	(+)	Cocos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color amarillo verdusco	(-)	(-)	(+)		
PS019	24976 cortA	(+)	(+)	Cocos	Colonia no tan bien delimitada, medio opaca, color blanco Cocos grandes	(-)	(-)	(+)		


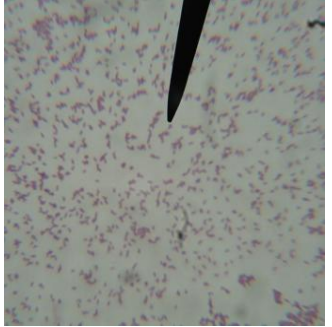

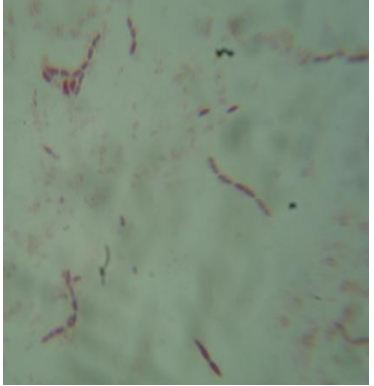
Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y amplificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Continuación.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS020	27852 cortA	(+)	(+)	Cocos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color amarillo verduzco	(-)	(-)	(+)		
PS021	27976 entC	(-)	(+)	Bacilos	Colonia no tan bien delimitada, medio opaca, color blanco Bacilos grandes, decolorados	(-)	(-)	(+)		

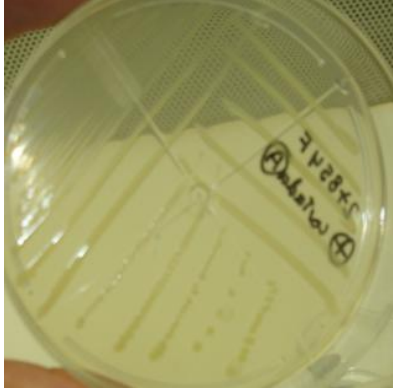
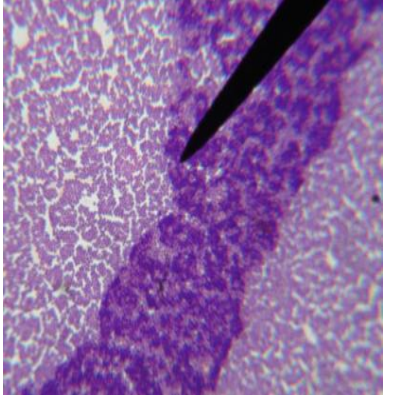
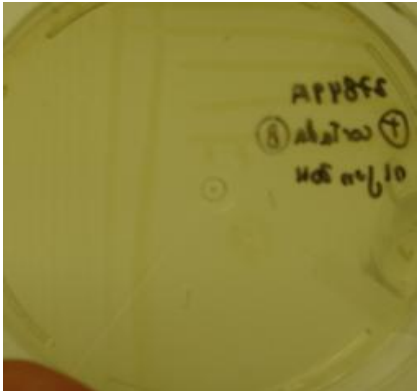
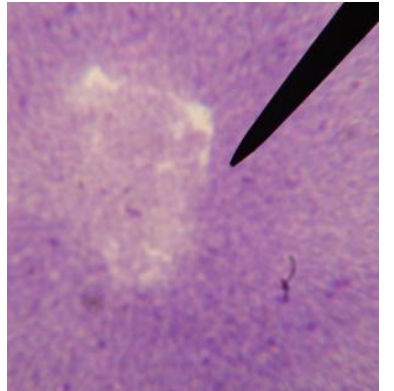
Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y amplificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Continuación.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS022	27854 cortB	(+)	(+)	Cocos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color blancuzco/transparente Pueden ser bacilos muy cortos	(-)	(-)	(+)		
PS023	24974 cortA	(+)	(+)	Cocos	Colonia no tan bien delimitada, medio opaca, color blanco Pueden ser bacilos muy cortos	(-)	(-)	(+)		


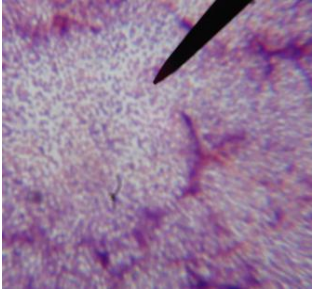

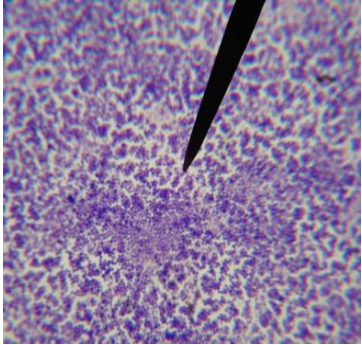
Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y amplificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Continuación.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS024	27976 entA	(-)	(+)	Bacilos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color amarillo verdusco	(-)	(-)	(+)		
PS025	24974 ent	(+)	(+)	Bacilos	Colonia no tan bien delimitada, medio opaca, color blanco	(-)	(-)	(+)		


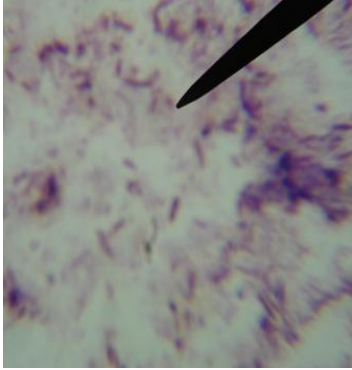

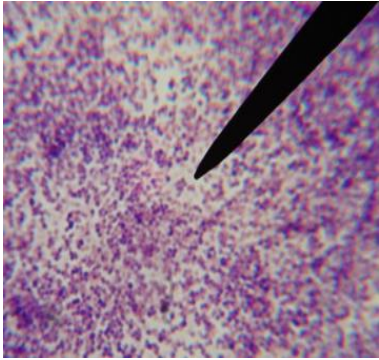
Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y amplificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Continuación.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS026	27854 cortA	(+)	(+)	Cocos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color blanco	(-)	(-)	(+)		
PS027	27849 cortB	(+)	(+)	Cocos	Colonia no tan bien delimitada, medio opaca, color blanco	(-)	(-)	(+)		


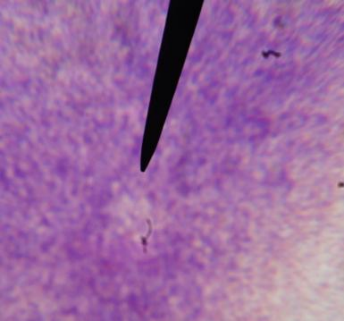

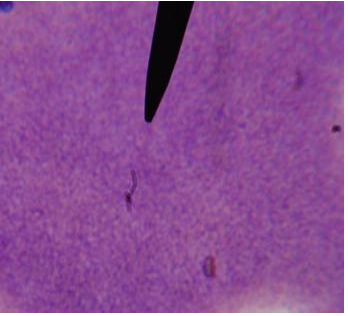
Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y amplificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Continuación.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS028	27852 ent	(+)	(+)	Cocos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color blanco	(-)	(-)	(+)		
PS029	27854 ent	(+)	(+)	Cocos	Colonia no tan bien delimitada, medio opaca, color blanco	(-)	(-)	(+)		

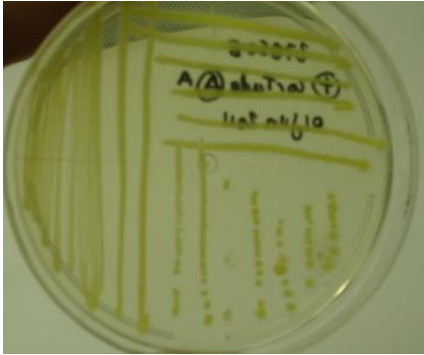
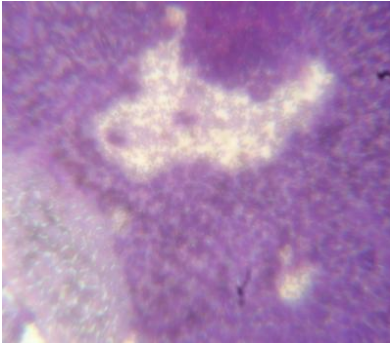

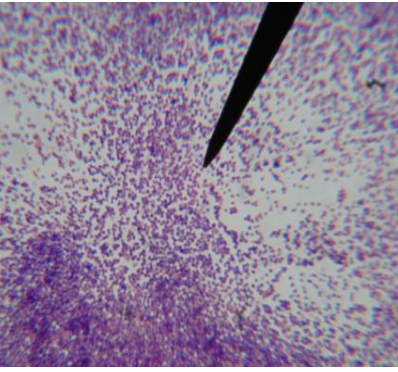
Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y amplificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Continuación.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS030	24976 ent	(+)	(+)	Bacilos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color amarillo verduzco Bacilos muy Grandes	(-)	(-)	(+)		
PS031	27849 ent	(+)	(+)	Cocos	Colonia no tan bien delimitada, medio opaca, color blanco	(-)	(-)	(+)		

Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y amplificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Continuación.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS032	27976 entB	(-)	(+)	Bacilos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color blanco	(-)	(-)	(+)		
PS033	27137 cortB	(+)	(+)	Bacilos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color amarillo verdusco	(-)	(-)	(+)		

Cuadro 5. Resultados de la morfología, tinción Gram y amplificaciones (con Cm3/4, Cm5/6 y 27F/1492R) de las bacterias aisladas. Continuación.

Cod. Sec.	Mx	Presencia en Semillas	Gram	Forma	Observaciones	Cm3 Cm4	Cm5 Cm6	27F 1492R	Foto Colonia	Foto Gram
PS034	27850 cortAA	(+)	(+)	Cocos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color amarillo verdusco	(-)	(-)	(+)		
PS035	27852 cortB	(+)	(+)	Cocos	Colonia bien delimitada, en forma de domo, brillante, color blanco	(-)	(-)	(+)		

Cuadro 6. Secuencia de cebadores utilizado para análisis moleculares. Este cuadro presenta las secuencias de los cebadores utilizados para PCR y la literatura de donde fueron extraídos

Cebador	Secuencia	Set	Producto de PCR	Cita
Cm3	5'- CCTCGTGAGTGCCGGGAACGTATCC - 3'	1F	645bp	(Sousa-Santos <i>et al.</i> 1997)
Cm4	5'- CCACGGTGGTTGATGCTCGCGAGAT - 3'	1R	645bp	(Sousa-Santos <i>et al.</i> 1997)
Cm5	5'- GCGAATAAGCCCATATCAA -3'	2F	<i>Pat-1</i> region, 614bp	(Dreier <i>et al.</i> 1994)
Cm6	5'- CGTCAGGAGGTCGCTAATA -3'	2R	<i>Pat-1</i> region, 614bp	(Dreier <i>et al.</i> 1994)
27F	5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3'	3F	16S rRNA región, 1.5kb	(Frank <i>et al.</i> 2008)
1492R	5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3'	3R	16S rRNA región, 1.5kb	(Frank <i>et al.</i> 2008)

Cuadro 7. Listado de semillas a utilizar. En este cuadro se brinda un listado de semillas, Gram registrado y cantidad de usada para realizar este estudio

No. de semilla	Gram registrado	Cant. uso
27976	(-)	4
27855	(+)	4
27954	(+)	4
27853	(+)	4
27852	(+)	4
27850	(+)	4
27849	(+)	4
27137	(+)	4
28205	(+)	8
24976	(+)	4
24974	(+)	4

Cuadro 8. Listado del muestras. En este cuadro se brinda un listado de las muestras y el código utilizado para secuenciación. En este cuadro, cort significa que se cortó la semilla y luego se sembró en NA, ent es que entera se dejó en NA. Las letras (por ej. A), significa la colonia que se aisló (en este caso A). en el caso de doble designación indica que de una primera colonia, se aislaron otras colonias (dependiendo de la letra en el dueto designado). Por ejemplo, AB, indicaría que la primera colonia es A, y de esa colonia surgieron otras dos, A y B, por lo que AB hace referencia a la subcolonia B de la colonia principal A

Código	Muestra (grupo 1)	Código	Muestra (Grupo 2)
PS001	27853cortA	PS019	24976cortA
PS002	27137cortAB	PS020	27852cortA
PS003	27976cortA	PS021	27976entC
PS004	27850cortBB	PS022	27854cortB
PS005	27850entA	PS023	24974cortA
PS006	27137cortAA	PS024	27976entA
PS007	27855cortA	PS025	24974ent
PS008	27849cortA	PS026	27854cortA
PS009	27853ent	PS027	27849cortB
PS010	27855ent	PS028	27852ent
PS011	27976cortB2	PS029	27854ent
PS012	27850cortAB	PS030	24976ent
PS013	27853cortC	PS031	27849ent
PS014	27976cortB1	PS032	27976entB
PS015	27850entB	PS033	27137cortB
PS016	27137entA	PS034	27850cortAA
PS017	27137entB	PS035	27852cortB
PS018	27853cortB		

Figura 16. Electroforesis Cm3/Cm4 del 09 de Noviembre del 2010. Esta electroforesis muestra los resultados de algunas muestras extraídas con dos diferentes protocolos de extracción de ADN (No. 1: Ayala *et al.* 2004; y No. 2: Mosca Blanca). También se compararon diferentes cantidades de ADN utilizado para el PCR. Las muestras se inyectaron en el orden que sigue: 1. MPM 1kb Promega, 2. Control positivo. 3. Mx₁5; 4. Mx₂5; 5. Mx₁3; 6. Mx₂3; 7. Mx₁1; 8. Mx₂; 9. Mx₃5; 10. Mx₄5; 11. Mx₃3; 12. Mx₄3; 13. Mx₃1; 14. Mx₄1; 15. Control negativo; 16. MPM 1kb Promega, donde Mx₁ es la muestra 28120A utilizando el método de extracción No. 2, Mx₂ es la muestra MA utilizando el método de extracción No. 2, Mx₃ es la muestra 28120A utilizando el método de extracción No. 1, y Mx₄ es la muestra MA utilizando el método de extracción No. 1. Los números seguidos al código de la muestra (1, 3 o 5) corresponde a la cantidad de ADN que se utilizó en esa muestra para realizar la amplificación.

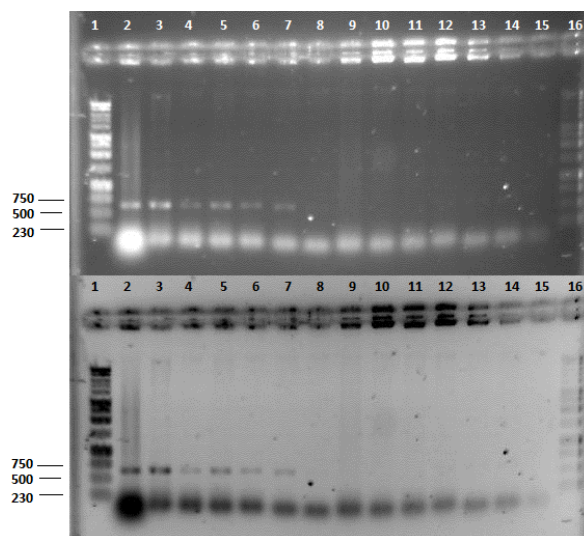


Figura 17. Electroforesis Cm5/Cm6 del 18 de Noviembre del 2010. Esta electroforesis muestra el resultado de la amplificación de muestras de ADN extraídas con el protocolo de extracción No. 2 (mosca blanca). El orden de las muestras es: 1. MPM 1kb Promega; 2. Control positivo Mx₁; 3. Mx₂; y 4. Control negativo; donde Mx₁ es la muestra 28120A y Mx₂ es la muestra MA. Para la amplificación de ambas muestras se utilizaron 5μL de ADN.

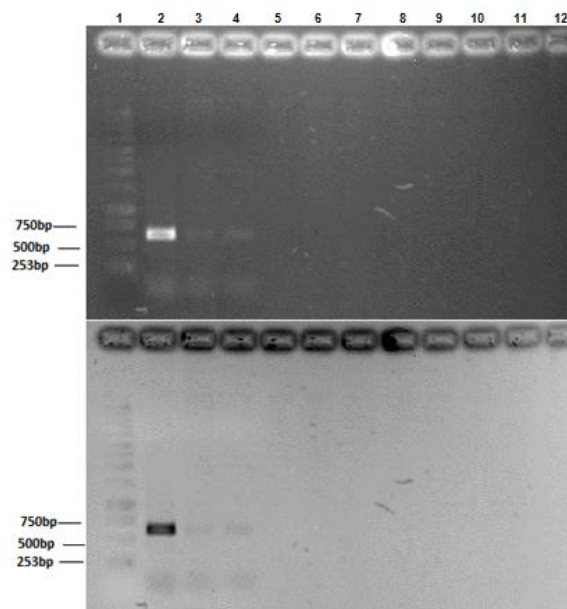


Figura 18. Electroforesis Cm3/Cm4 del 02 de Diciembre del 2010. Esta electroforesis muestra los resultados de algunas muestras extraídas con el protocolo de extracción de ADN No. 2 (mosca blanca). La dilución de ADN de las muestras es 1/10. Las muestras se inyectaron en el orden que sigue: PEINE 1: 1. MPM 1kb Promega; 2. Control positivo; 3.202s; 4.202p; 5.203s; 6.203p; 7.204s; 8.204p; 9.205s; 10. 205p; 11. 206s; 12. Control negativo. PEINE 2: 1. MPM 1kb promega; 2. Control positivo; 3. 206p; 4. 207s; 5. 207p; 6. 155s; 7. 155p; 8. 101.10; 9. Control negativo; 10-12. Vacío; donde el número de la muestra corresponde al mismo número con un 28 antecedido (ej. 205 es en verdad 28205), la s indica que la muestra proviene de semilla mientras que la p indica que es plántula. El control positivo es la muestra 28202 de plántula, mientras que el control negativo es la muestra 28202 de semilla

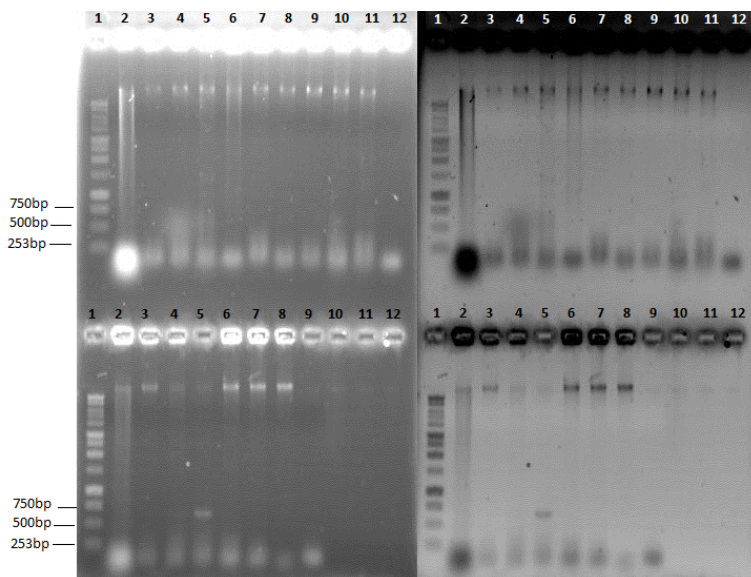


Figura 19. Electroforesis Cm3/Cm4 del 25 de Abril del 2011. Esta electroforesis muestra los resultados de algunas muestras extraídas utilizando las instrucciones del Kit de extracción de ADN, DNeasy Blood & Tissue kit marca Qiagen. En el PEINE 1, del pozo 3 al pozo 9, y en PEINE 2 del pozo 7 al 12, la extracción para dichas muestras fue el protocolo No. 2 (mosca blanca); mientras que para el resto de las muestras la extracción llevada a cabo mediante el kit Quiagen. El orden de inyección es: PEINE 1: 1. MPM 1kb promega; 2. Control positivo; 3. Gram 12; 4. Gram 6; 5. Gram 25; 6. Gram 25b; 7.H3, 8.MX, 9.Control negativo; 10.Gram 12 kit; 11.Gram 6 kit; 12.Gram 25 kit; 13.Gram 25b kit; 14.MX kit; 15.H2 kit; 16. H3 kit. PEINE 2: 1. MPM 1kb promega; 2.Gram 12 kit; 3.Gram 6 kit; 4.Gram 25 kit; 5.Gram 25b kit; 6.MX kit; 7.H2, 8.H3; 9.H4; 10. Control negativo; 11. Control positivo; 12. Vacío.

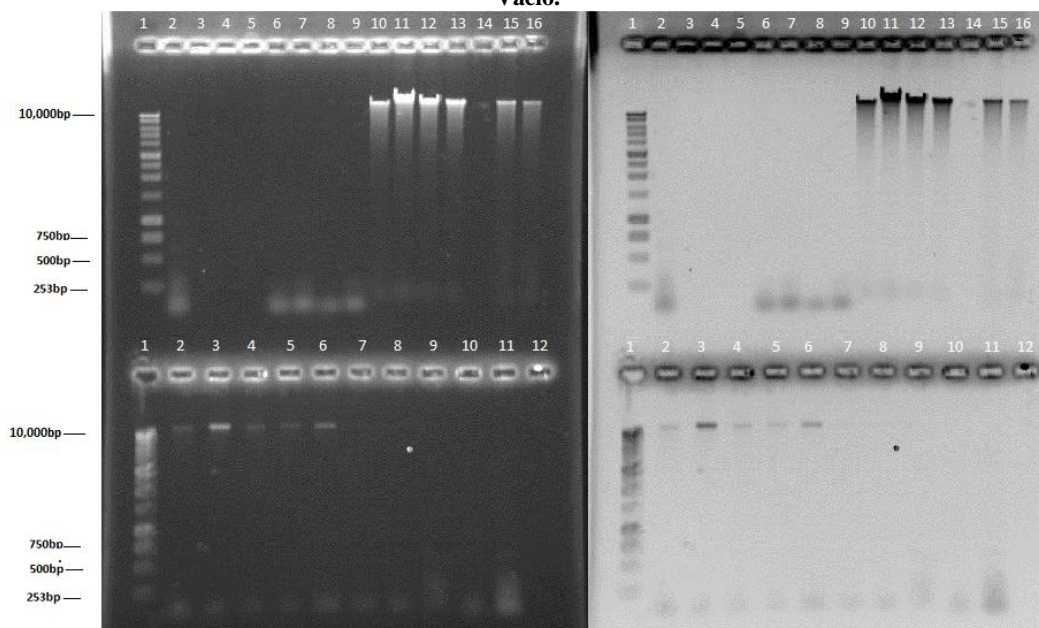


Figura 20- Electroforesis 27F/1492R del 23 de Junio del 2011. Este gel muestra los resultados de la amplificación del gen ARNr 16S utilizando los cebadores 27F y 1492R. El ADN de las muestras fue extraído utilizando el kit Qiagen DNeasy. Se diluyó a 1/50 para el PCR. El orden de las muestras es como sigue: 1. MPM 1kb promega; 2. PS008; 3. PS007; 4. PS006; 5. PS009; 6. PS010; del 7-12: Vacío.

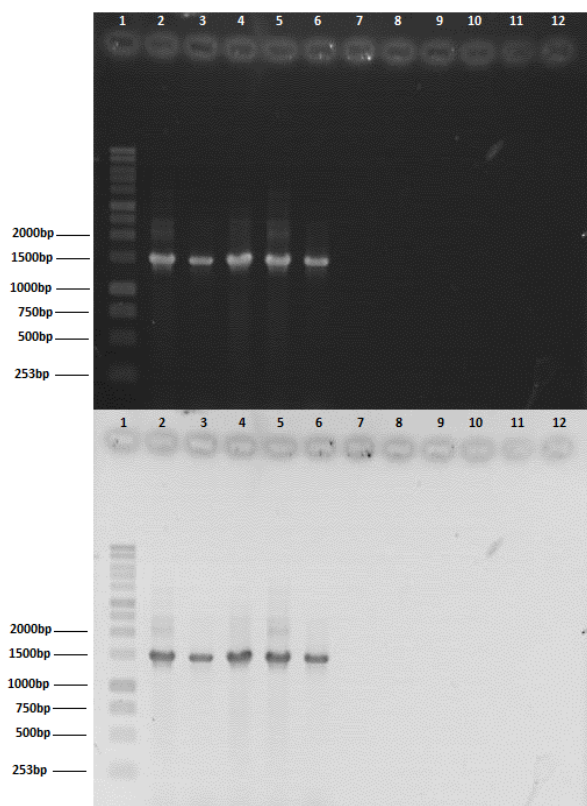


Figura 21- . Electroforesis 27F/1492R del 28 de Junio del 2011. Este gel muestra los resultados de la amplificación del gen ARNr 16S utilizando los cebadores 27F y 1492R. El ADN de las muestras fue extraído utilizando el kit Qiagen DNeasy. Se diluyó a 1/100 para el PCR. El orden de las muestras es como sigue: 1. MPM 1kb promega; 2.PS001; 3.PS002; 4.PS003; 5.PS004; 6.PS005; 7.PS006; 8.PS007; 9.PS008; 10.PS009; 11.PS010; 12.PS011.

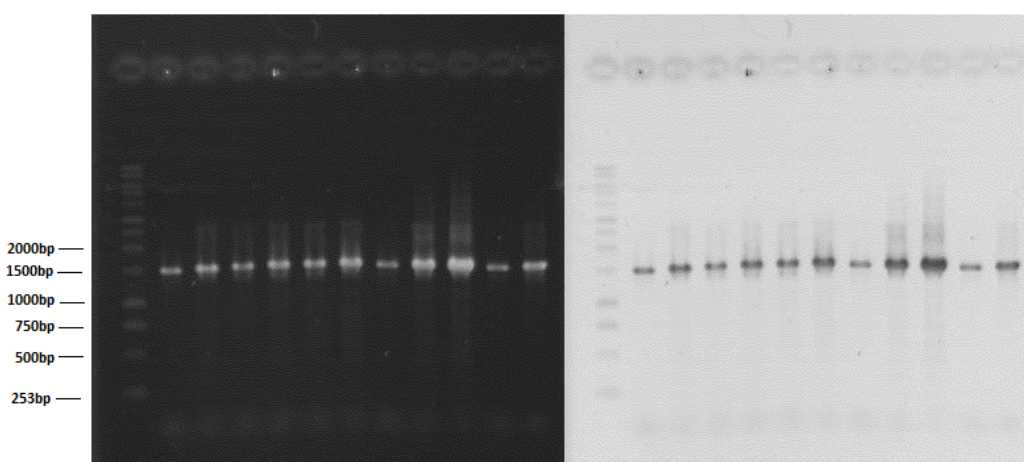


Figura 22. Electroforesis Cm3/Cm4 del 08 de Julio del 2011. Esta electroforesis muestra el resultado de la amplificación con cebadores Cm3/Cm4, utilizando ADN diluido a 1/100 extraído con el Kit Qiagen DNeasy. El orden de las muestras es como sigue: PEINE 1: 1. MPM 1kb promega; 2. Control positivo; 3. PS012; 4. PS013; 5. PS017; 6. PS014; 7. PS001; 8. PS016; 9. PS015; 10. PS005; 11. PS002; 12. Vacío. PEINE 2: 1. MPM 1kb promega; 2. Control positivo; 3. PS004; 4. PS003; 5. PS018; 6. PS011; del 7 al 12: Vacío. El control positivo utilizado fue la muestra 495.

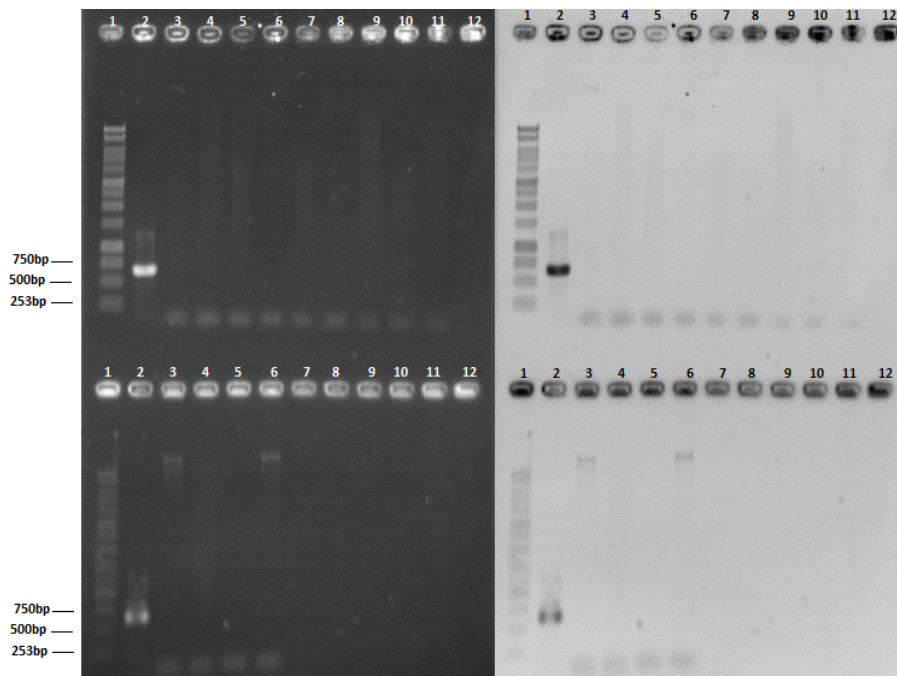


Figura 23. Electroforesis Cm5/Cm6 del 08 de Julio del 2011. Esta electroforesis muestra el resultado de la amplificación con cebadores Cm5/Cm6, utilizando ADN diluido a 1/100 extraído con el Kit Qiagen DNeasy. El orden de las muestras es como sigue: PEINE 1: 1. MPM 1kb promega; 2. Control positivo; 3. PS012; 4. PS013; 5. PS017; 6. PS014; 7. PS001; 8. PS016; 9. PS015; 10. PS005; 11. PS002; 12. Vacío. PEINE 2: 1. MPM 1kb promega; 2. Control positivo; 3. PS004; 4. PS003; 5. PS018; 6. PS011; del 7 al 12: vacío. El CTRL (+) utilizado fue la muestra 495.

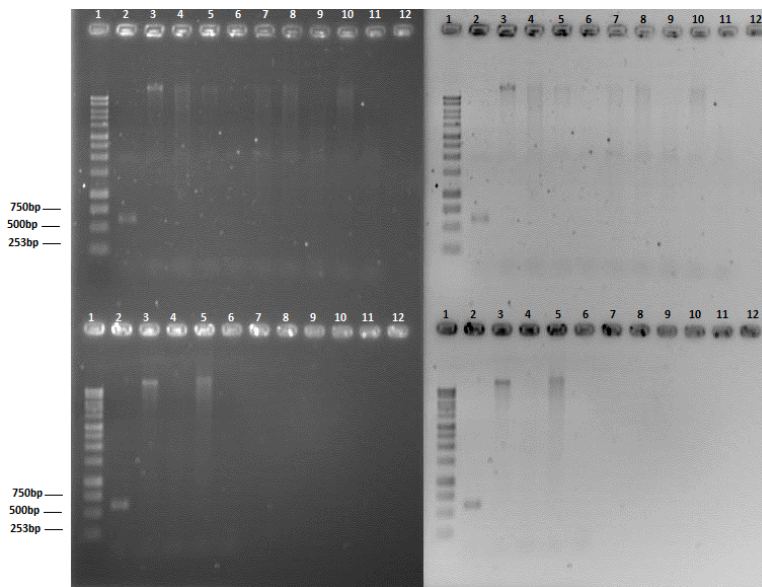


Figura 24. Electroforesis 27F/1492R del 14 de Julio del 2011. Esta electroforesis muestra el resultado de la amplificación del ARNr 16S del grupo No. 2 de muestras. El ADN de estas muestras fue extraído hirviendo la colonia y luego haciendo una dilución de 1/500 para PCR. El orden de las muestras es como sigue: PEINE 1. MPM 1kb promega; 2. PS012 triplicado 2; 3. PS012 triplicado 3; 4. PS035; 5. PS025; 6. PS023; 7. PS031; 8. PS019; 9. PS028; 10. PS032; 11. PS030; 12. PS020. PEINE 2: 1. MPM 1kb promega; 2. PS029; 3. PS033; 4. PS034; 5. PS027; 6. PS026; 7. PS024; 8. PS022; 9. PS021; del 10 al 12: Vacío

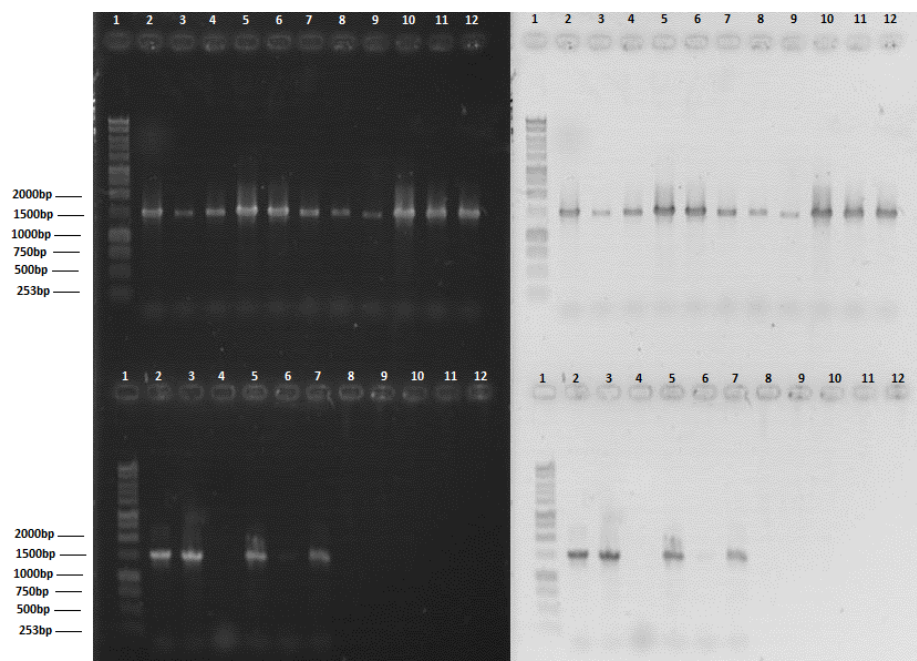


Figura 25. Electroforesis del producto de PCR ya purificado de ARNr16S. Esta electroforesis muestra el resultado de la amplificación del ARNr 16S todas las muestras trabajadas. El orden de las muestras es como sigue: PEINE 1. MPM 1kb promega; 2. PS001; 3. PS002; 4. PS003; 5. PS004; 6. PS005; 7. PS006; 8. PS007; 9. PS008; 10. PS009; 11. PS010; 12. Vacío. PEINE 2: 1. MPM 1kb promega; 2. PS011; 3. PS012; 4. PS013; 5. PS014; 6. PS015; 7. PS016; 8. PS017; 9. PS018; 10. PS019; 11. PS020; 12. Vacío.

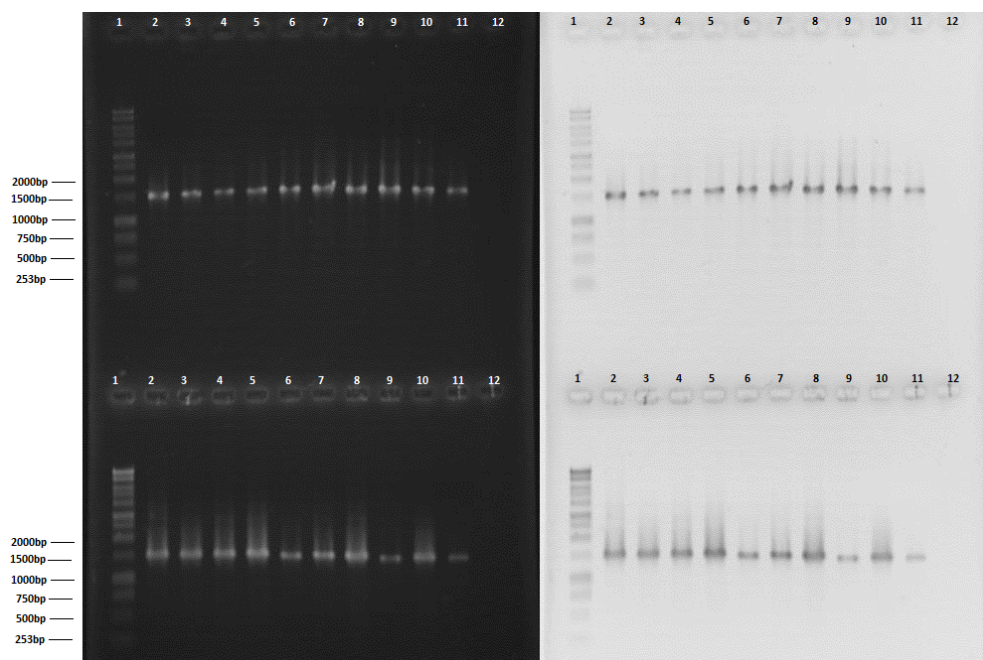


Figura 26. Electroforesis del producto de PCR ya purificado de ARNr16S. Esta electroforesis muestra el resultado de la amplificación del ARNr 16S todas las muestras trabajadas. El orden de las muestras es como sigue: PEINE 1.

MPM 1kb promega; 2.PS021; 3. PS022; 4.PS023; 5.PS024; 6.PS025; 7.PS026; 8.PS027; 9.PS028; 10.PS029; 11.PS030; 12. Vacío. PEINE 2: 1. MPM 1kb promega; 2. PS031; 3. PS032; 4. PS033; 5. PS034; 6. PS035; del 7 al 12: Vacío.

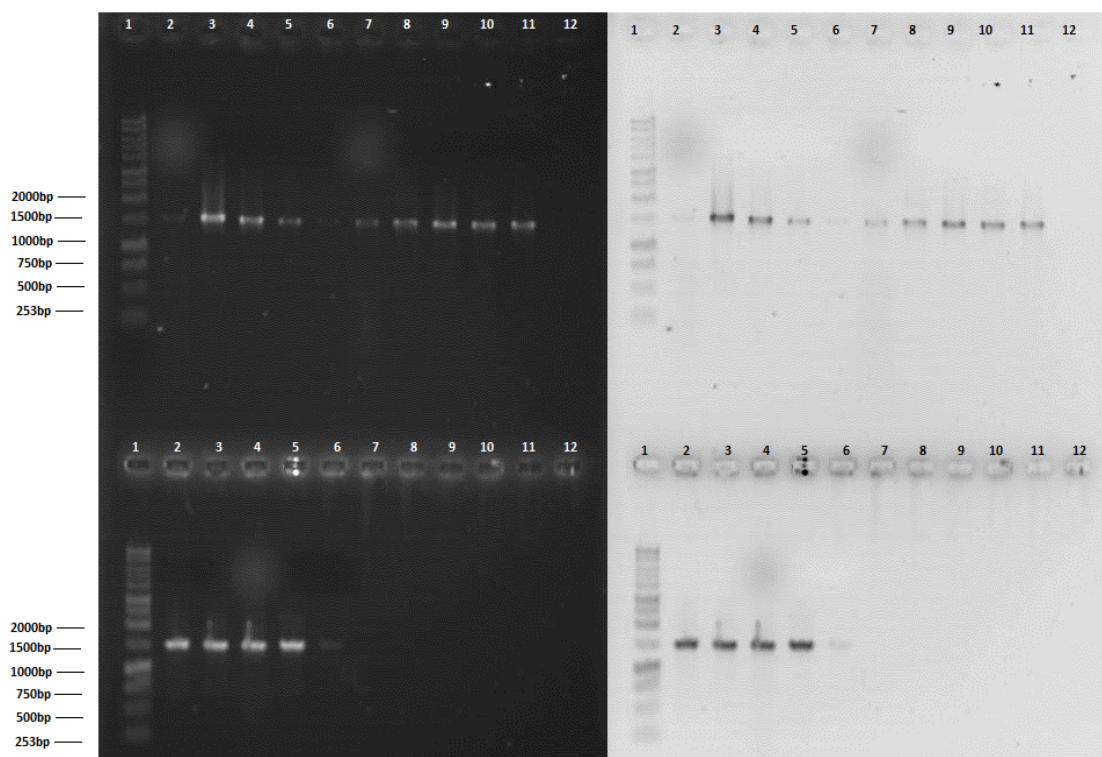


Figura 27. Electroforesis Cm3/Cm4 del 03 de Agosto del 2011. Esta electroforesis muestra el resultado de la amplificación del producto de Cm3/Cm4. Las muestras utilizadas se extrajeron con un protocolo dirigido a extracción de plásmidos, y luego el ADN se diluyó a 1/20; 1/50 y 1/100 para PCR. El orden de las muestras es como sigue: 1. MPM 1kb promega; 2.CTRL (+) ; 3. PS003 1/20; 4. PS003 1/50; 5. PS003 1/100; 6. PS004 1/20; 7. PS004 1/50; 8. PS004 1/100; DEL 9 – 12 Vacío. Se utilizó como CTRL (+), el 210t a 1/20

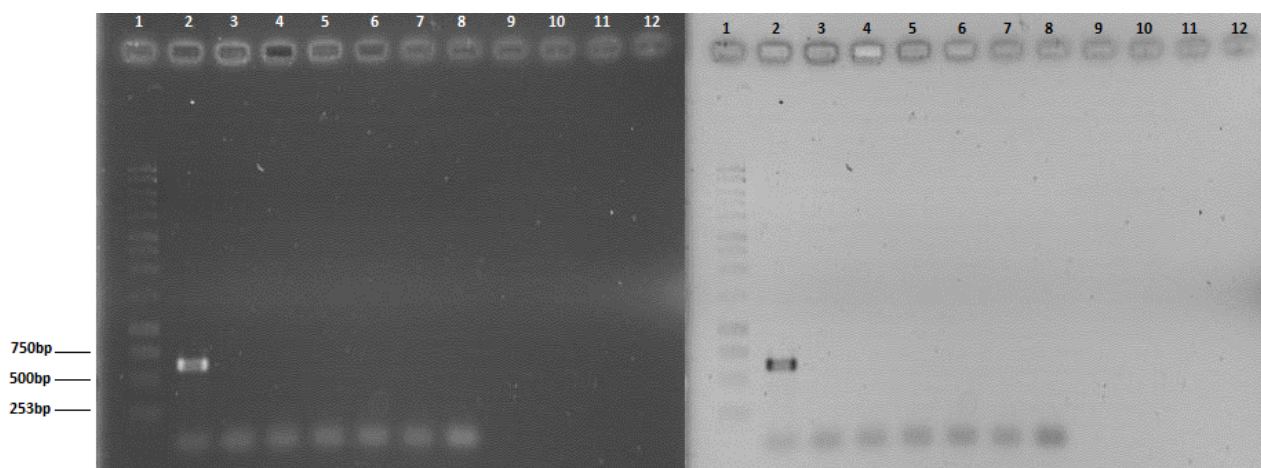


Figura 28. Electroforesis Cm5/Cm6 del 03 de Agosto del 2011. Esta electroforesis muestra el resultado de la amplificación del producto de Cm5/Cm6. Las muestras utilizadas se extrajeron con un protocolo dirigido a extracción de plásmidos, y luego el ADN se diluyó a 1/20; 1/50 y 1/100 para PCR. El orden de las muestras es como sigue: 1. MPM 1kb promega; 2. CTRL (+) ; 3. PS003 1/20; 4. PS003 1/50; 5. PS003 1/100; 6. PS004 1/20; 7. PS004 1/50; 8. PS004 1/100. Se utilizó como CTRL (+), el 210t a 1/20.

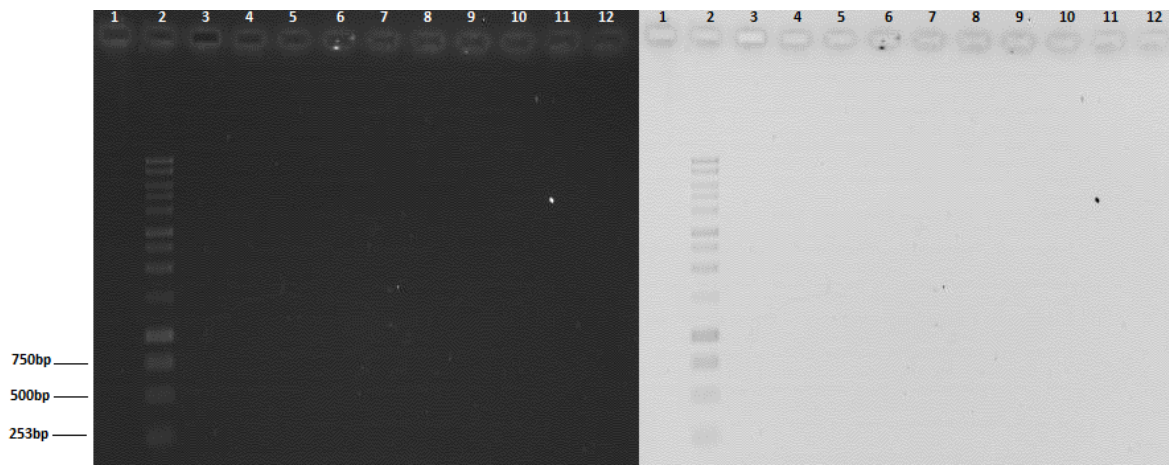


Figura 29. Electroforesis de controles Cm5/Cm6 del 12 de Agosto del 2011. Esta electroforesis muestra el resultado de la amplificación en controles de Cm5/Cm6. Se utilizaron diferentes controles y unas muestras de la Lic. Elena Dardón para el PCR. El orden de las muestras es como sigue: 1. MPM 1kb promega; 2 al 4; Vacío; 5. MPM 1kb promega; 6. C+ (1:20); 7. C+ 28101 (1/5); 8. C+ 210t (1/4); 9. 29653NLAV de la Lic. Elena Dardón; 10. 29657NoLAV de la Lic. Elena Dardón; 11. PS003 (1/20); 12. PS004 (1/20).

