



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Tesina de Grado

Licenciatura en Bioquímica

Estudio comparativo de cepas aisladas en Uruguay de la bacteria fitopatógena *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causante del cancro bacteriano del tomate



Carolina Ramponi Weill

Tutora: Dra. María Inés Siri

Co-tutora: Msc. Valentina Croce

Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias,
Facultad de Química, Universidad de la República
Febrero, 2018

RESUMEN

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Cmm) es el microorganismo responsable del cancro bacteriano del tomate. Esta enfermedad es uno de los principales problemas fitosanitarios que afecta dicho cultivo en todas las regiones productoras de tomate del mundo. La principal fuente de inóculo de Cmm son las semillas infectadas y estas son las responsables de los brotes de infección. En Uruguay, las semillas son importadas de diversos orígenes y no sufren control fitosanitario. Estudios previos basados en el análisis filogenético de cinco genes (MLSA-MLST) permitió agrupar las cepas presentes en Uruguay en 12 tipos de secuencia (STs). Sin embargo, no se sabe si esta diferenciación genotípica tiene una correlación con aspectos relacionados a la virulencia de Cmm. El objetivo principal de este trabajo fue realizar un análisis comparativo sobre los mecanismos de virulencia y capacidad de infección de estas cepas en plantas de tomate. Para esto, se propuso evaluar la agresividad del patógeno en tomate, la colonización en etapas tempranas de la infección y la producción de biofilm. En primer lugar, se realizaron ensayos de inoculación en plantas de tomate con los 12 STs de Cmm para evaluar la aparición de síntomas y la evolución de la enfermedad. La mayoría de las cepas presentaron altos niveles de agresividad, con aparición de síntomas luego de 11-17 días posteriores a la inoculación y afectando a todas las plantas a los 28 días. Sin embargo, las plantas inoculadas con la cepa de Cmm MAI1001 (ST 3) permanecieron asintomáticas hasta el final del ensayo, aunque se verificó la presencia del patógeno viable en los tejidos. Para las otras 11 cepas, no se observaron diferencias significativas en el tiempo de aparición del primer síntoma, pero sí se observó un gradiente en la evolución de la enfermedad pudiendo distinguir dos grupos de cepas con mayor y menor agresividad. En segundo lugar, se optimizó un método para la cuantificación absoluta de Cmm *in planta* mediante PCR cuantitativa (qPCR). Se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de las diferentes cepas de Cmm *in planta* luego de 3 días de infección, variando en un gradiente entre 10^3 - 10^5 equivalentes genómicos/g. Finalmente, se estudió la capacidad de formación de biofilm como factor de virulencia de las diferentes cepas de Cmm. Para ello, se evaluaron diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación en el ensayo de biofilm con tinción con cristal violeta en placa de microtitulación. Se pudo verificar la producción de *biofilm* para los 12 STs. En este trabajo, no se observaron fuertes correlaciones entre los distintos aspectos evaluados, lo que sugiere que la virulencia de Cmm es un rasgo complejo determinado por múltiples factores. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos se destacan algunas cepas de Cmm con mayor virulencia (STs 6, 8 y 12), así como una cepa (ST 3) que es capaz de colonizar y multiplicarse *in planta* sin causar síntomas.

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
ABCPE	Área bajo la curva de progresión de la enfermedad
AFLP	<i>Amplified fragment length polymorphism</i>
Cm	Centímetro
Cmm	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
CDS	Secuencias codificantes
Cq	Valor umbral de ciclo
Dpi	Día post inoculación
Eg	Equivalentes genómicos
EPS	Exopolisacáridos
g	Gramo
kDa	Kilo Dalton
Kb	Kilo bases
mL	Mililitro
MLSA	<i>Multilocus Sequence analysis</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
IPA	Isla de patogenicidad
ISSR	<i>Inter simple Sequence repeats</i>
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PRR	Receptores de membrana
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
Rep- PCR	<i>Repetitive element sequence-based PCR</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
ST	Variantes alélicas
Subsp	Subespecie
Ufc	Unidades formadoras de colonias
µL	Microlitro

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Cancro bacteriano de tomate	1
1.2 El patógeno: <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	6
1.3 Interacción planta-patógeno.....	10
1.4 Diversidad genética del patógeno.....	13
1.5 Antecedentes en Uruguay.....	13
1.6 Hipótesis de trabajo	17
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivos generales.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
2.3 Estrategia de trabajo	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
3.1 Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento	20
3.2 Inoculación de plántulas de tomate.....	21
3.3 Evaluación de agresividad en tomate	21
3.4 Cuantificación de Cmm por recuento en microgota	22
3.5 Optimización de un procedimiento para la cuantificación de Cmm <i>in planta</i> mediante qPCR.....	23
3.6 Seguimiento del proceso de infección de Cmm en plantas de tomate inoculadas	27
3.7 Análisis comparativo de la multiplicación en planta de los 12 STs de Cmm.....	28
3.8 Evaluación de la capacidad de producción de biofilm	28
3.9 Análisis estadísticos.....	29
4. RESULTADOS	31
4.1 Evaluación de agresividad en tomate	31
4.2 Optimización de un método para la cuantificación de Cmm <i>in planta</i> mediante qPCR.....	35
4.3 Seguimiento del proceso de infección de una cepa de Cmm en plantas de tomate inoculadas	41
4.4 Análisis comparativo de la multiplicación <i>in planta</i> de los 12 STs de Cmm.....	43
4.5 Evaluación de factores de patogenicidad	46
5. DISCUSIÓN.....	48
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	54
7. APÉNDICE	55

7.1	Medios de cultivo	55
7.2	Tablas de valores de Cq de las reacciones de qPCR	57
8.	BIBLIOGRAFÍA	61

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cancro bacteriano de tomate

1.1.1 Antecedentes, importancia y distribución

El cancro bacteriano del tomate es una de las enfermedades más serias que afecta la producción de este cultivo tanto en campo como en invernadero (Flügel *et al.*, 2012). El patógeno responsable, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm), tiene diferentes cepas a nivel mundial que pueden exhibir diferentes niveles de agresividad (Sueno *et al.*, 2015). La enfermedad fue reportada por primera vez en Michigan, EE.UU, en 1909 y actualmente está presente en la mayoría de las regiones productoras de tomate del mundo (De León *et al.*, 2011). En Uruguay, esta enfermedad se reportó por primera vez en la década del 80 y es considerada de gran importancia económica ya que ha causado diversas epidemias a lo largo de los años (Lasa *et al.*, 1981; Maeso y Walasek, 2012). Si bien el hospedero de mayor importancia económica es el tomate (*Solanum lycopersicum*), se ha encontrado que el patógeno es capaz de sobrevivir en hospederos alternativos, incluyendo especies solanáceas y no solanáceas (Zaluga *et al.*, 2013).

Desde su aparición, Cmm se ha esparcido por el mundo causando pérdidas económicas de hasta un 80% en campo (Frenkel *et al.*, 2016), y en invernadero puede acabar con el cultivo en cuestión de días (Tlatilpa, 2010). Por esta razón, en diversas regiones del mundo, como ser Asia, Europa, el Caribe y África, Cmm ha sido clasificado como patógeno cuarentenario (EPP0, 2016). Sin embargo, en Uruguay, Cmm no pertenece a la lista de patógenos cuarentenarios, por lo que no se realiza ningún control fitosanitario a las semillas de tomate que ingresan al país (MGAP/DIGESSAA, 2010).

1.1.2 Ciclo de la enfermedad

La principal fuente de inóculo de Cmm son las semillas y éstas son las responsables de los brotes de infección. En la semilla, Cmm puede permanecer viable por al menos 5 años (Sueno *et al.*, 2015), lo que permite su diseminación a largas distancias y su introducción en áreas libres de cancro del tomate. Se ha reportado que una concentración de tan solo 10^2 ufc es suficiente para la

transmisión del patógeno mediante semilla (De León *et al.*, 2011). A su vez, experimentos en campo indican que una semilla infectada en 10.000 es suficiente para iniciar una epidemia (Chang *et al.*, 1991).

Los restos de plantas de tomate contaminadas, los trasplantes de plántulas infectadas sin síntomas o las poblaciones del patógeno en la superficie de las hojas de hospederos alternativos también son fuente común de inóculo primario de la enfermedad (Chalupowicz *et al.*, 2016). El patógeno puede diseminarse también por diversas prácticas culturales, como la poda, el riego, y es capaz de sobrevivir en suelo y cualquier herramienta gracias a su habilidad para tolerar la desecación y las temperaturas frías. Las infecciones secundarias se dan generalmente por la entrada de la bacteria a través de aberturas naturales, como ser estomas, o a través de heridas y raíces. Una vez dentro de la planta, la bacteria se multiplica en los vasos del xilema, formando extensas estructuras *biofilm-like* que ayudan a la colonización del patógeno y su movimiento dentro de la planta (Chalupowicz *et al.*, 2012). Dicha multiplicación lleva a una infección sistémica, debido a que mediante los vasos vasculares la bacteria logra colonizar toda la planta. La infección sistémica provoca los síntomas característicos del cancro y eventualmente la muerte de la planta.

La infección por Cmm puede ocurrir en múltiples etapas del proceso de producción de tomate, lo que resulta en grados variables de la severidad de la enfermedad. Por ejemplo, si la infección ocurre en un estadio tardío de la planta, esta puede sobrevivir y producir frutos. Estos frutos pueden presentar síntomas y a su vez, producir semillas contaminadas. En este tipo de infecciones puede ocurrir que la planta sea asintomática (Sen *et al.*, 2015).

La interacción de Cmm con la planta de tomate se ha dividido en dos fases: una fase endofítica y una fase productora de síntomas. La transición de la primera a la segunda fase se da luego de una extensa multiplicación de la bacteria dentro del xilema de la planta (Chalupowicz *et al.*, 2012). Se piensa que el patógeno cambia su comportamiento dentro de la planta cuando la población supera los 10^8 ufc/g gracias a un fenómeno dependiente de "*quorum sensing*" (Sen *et al.*, 2015).

1.1.3 Sintomatología

El cancro bacteriano del tomate es una enfermedad que presenta diversos síntomas característicos en la planta. Sin embargo, estos síntomas dependerán de la susceptibilidad del cultivar, las condiciones de crecimiento de la planta, el tiempo

y el tipo de infección (si es sistémica o localizada), entre otros factores (De León *et al.*, 2011).

Las infecciones sistémicas son el resultado de semillas contaminadas o heridas profundas en la planta. Los principales síntomas en este tipo de infección son la pérdida de áreas fotosintéticas, el marchitamiento unilateral, el retraso del crecimiento, canchales en el tallo, la decoloración vascular y la muerte prematura (Figura 1-1) (Gleason *et al.*, 1993). Las semillas contaminadas dan lugar en un principio a plántulas aparentemente sanas, los síntomas característicos del canchale aparecen recién cuando la planta alcanza la madurez. En este tipo de infección, el patógeno invade el tejido vascular, causando principalmente el marchitamiento unilateral en hojas, seguido del marchitamiento de la planta entera, necrosis y canchales en el tallo y los pecíolos (Chalupowicz *et al.*, 2016). En invernáculos, el primer síntoma es el marchitamiento unilateral de las hojas. Las hojas pueden presentar áreas con necrosis de color blanco y luego marrones. El marchitamiento se vuelve rápidamente irreversible y la planta muere por desecación. En el campo, el primer síntoma es la desecación en el borde de las hojas y la planta se deseca lentamente normalmente sin presentar marchitamiento (EPPO, 2016)

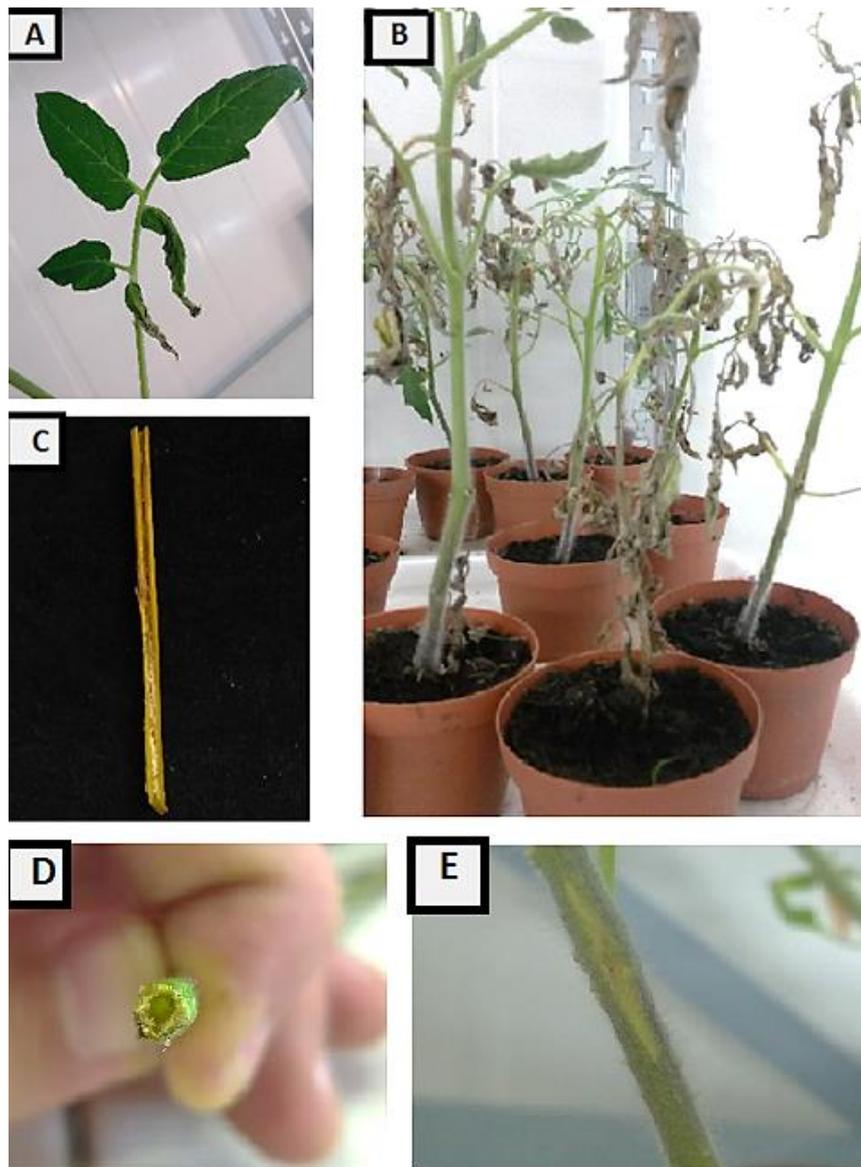


Figura 1-1. Síntomas típicos de una infección sistémica causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en plantas de tomate. A: marchitamiento unilateral de la hoja; B: marchitamiento generalizado; C y D: decoloración vascular; E: canchros en tallo.

Las infecciones localizadas, las cuales ocurren gracias al ingreso del patógeno por aperturas naturales de la planta o heridas superficiales en la misma, producen síntomas como la necrosis marginal, “bird’s eye spots” en los frutos y ampollas en las hojas (Figura 1-2). Los síntomas en las hojas durante las infecciones localizadas son visibles dentro de los 5-7 días post- inoculación (Chalupowicz et al., 2016). Una infección localizada puede llevar a una infección sistémica gracias a la entrada de la bacteria a los tejidos vasculares de la planta (De León et al., 2008).

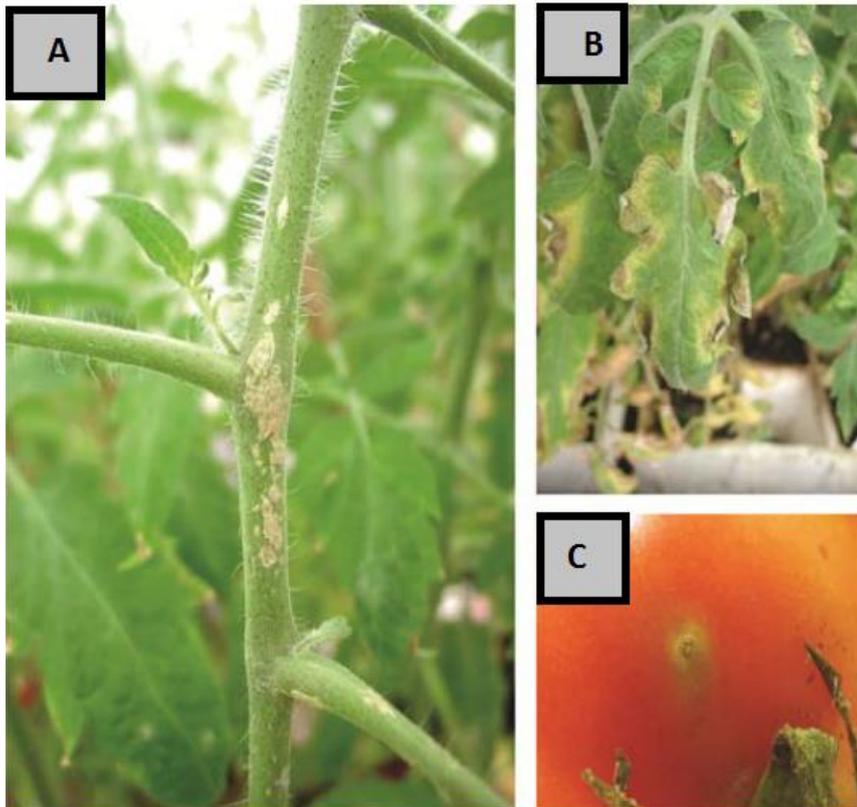


Figura 1-2 Síntomas típicos de una infección localizada causada por *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en plantas de tomate. A: en tallo; B: en hojas; C: en frutos (Fuente: De León *et al.*, 2011).

Cmm puede causar también infecciones latentes que no producen ningún síntoma visible. Esta capacidad permite al patógeno invadir las semillas de las plantas que todavía son capaces de producir frutos favoreciendo su diseminación (Flügel *et al.*, 2012).

1.1.4 Mecanismos de control

El cancro bacteriano es una de las enfermedades del tomate más difíciles de controlar una vez que el patógeno se establece en el área de producción (Burokiené, 2006). Aunque algunas especies de tomate salvajes resultaron ser resistentes al patógeno (van Heusden *et al.*, 1999; Sen *et al.*, 2012), hasta el momento no hay cultivares comerciales de tomate resistentes (Sueno *et al.*, 2015), y no existe ningún método de control químico disponible para prevenir las infecciones. Por lo cual, el método de control más eficiente es el control preventivo, que consiste en evitar que el patógeno entre en contacto con el cultivo. Una de las formas de lograrlo es mediante el uso de semillas libres de Cmm (Flügel *et al.*, 2012). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, este patógeno es capaz de sobrevivir en suelo durante largos períodos, con lo cual, el uso de semillas libres de

Cmm no asegura que no ocurra una epidemia en campo. Es por esto, que también se recomienda la rotación del cultivo a un campo donde no se haya plantado tomate por 2-3 años (Fatmi y Schaad, 2002). Si la infección se establece en el cultivo, se deben tomar las prácticas culturales adecuadas para reducir el riesgo de la diseminación de la enfermedad y la ocurrencia de nuevos brotes de infección (De León *et al.*, 2011).

También se han estudiado diversos mecanismos de control que incluyen el control químico y el control biológico. Someter a las semillas contaminadas a tratamientos químicos y térmicos demostró cierta efectividad. Sin embargo, estos tratamientos limitan considerablemente la población de Cmm, pero no logran erradicarla completamente sin disminuir la capacidad de germinación de las semillas (De León *et al.*, 2011). Se probaron diversos tipos de bactericidas (hidróxido de cobre, mancozeb y estreptomycin) que ayudan al manejo de la enfermedad disminuyendo el tamaño de las poblaciones previniendo el desarrollo de síntomas severos y la diseminación del patógeno entre las plántulas de tomate en invernáculos. (Hausbeck *et al.*, 2000; Werner *et al.*, 2002).

Por otro lado, existen 3 formas posibles de control biológico: utilización de microorganismos antagonistas (Boudyach *et al.*, 2001), el uso de fungicidas derivados de plantas y la manipulación de la resistencia del hospedero (Soylu *et al.*, 2003) . Sin embargo, el uso de estas alternativas está lejos de proporcionar un control exitoso de la enfermedad en el cultivo de tomate (De León *et al.*, 2011).

1.2 El patógeno: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

1.2.1 Características generales

El género *Clavibacter* pertenece a la clase Actinobacteria del dominio Bacteria, orden Actinomycetes, familia Microbacteriaceae. Este género incluye una única especie, *Clavibacter michiganensis*, la cual está dividida en 9 subespecies, de las cuales 2 no son patógenas, y las otras 7 son patógenas de plantas (Gartemann *et al.*, 2003; Oh *et al.*, 2016). Las subespecies patógenas se diferencian por el tipo de enfermedad ocasionada así como en rango de hospederos (Tabla 1-1).

Tabla 1-1. Enfermedades ocasionadas en los distintos hospederos por las distintas subespecies de *Clavibacter michiganensis*. Fuente: Gartemann et al. (2003) y Oh et al (2016).

Espece patógena	Enfermedad ocasionada	Hospedero
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Necrosis bacteriana	Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	Marchitamiento	Maíz (<i>Zea mays</i>)
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>tesselarius</i>	Pecas y puntos en hojas	Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	Marchitamiento y retraso de crecimiento	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>phaseoli</i>	Amarillamiento de la hoja	Poroto (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>capsici</i>	Cancro bacteriano	Morrón (<i>Capsicum annum</i> y <i>Capsicum frutescens</i>)
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Cancro bacteriano	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)

Como características generales, Cmm es un bacilo gram positivo, de crecimiento aeróbico, no móvil, productor de cápsula y que no forma esporas. Además presenta las pruebas de oxidasa y ureasa negativas (Agrios, 2005). La temperatura óptima de crecimiento es de 25°C pero puede crecer a temperaturas entre los 20°C y 30°C y es capaz de sobrevivir hasta los 50°C. El pH óptimo para su crecimiento se encuentra entre 7 y 8 pero puede crecer en el xilema de la planta que tiene un pH de 5 (Sen et al., 2015).

1.2.2 Generalidades del genoma de Cmm y sus principales factores de patogenicidad

Hasta el momento, existen seis cepas de Cmm (NCPPB382, CASJ001, CASJ004, CASJ007, CASJ008 y LMG 7333) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con su genoma completamente secuenciado. El genoma está compuesto por un único cromosoma de 3,3 x 10⁶ pb y dos plásmidos circulares, pCM1 que tiene 2,7 x 10⁴ pb y pCM2 con 6,9 x 10⁴ pb. El cromosoma tiene un alto contenido en bases GC, más precisamente de 72.66%, mientras que los plásmidos tienen un contenido en GC más bajo (Gartemann et al., 2008).

El cromosoma de Cmm contiene un total de 2984 secuencias codificantes (CDS). Se le asignó función biológica únicamente a un 68% de estas, el resto

corresponden a CDS hipotéticas. Contiene únicamente 24 pseudogenes, de los cuales la mitad están asociados con las regiones de bajo contenido en GC. Existen alrededor de 20 regiones de bajo contenido GC. La región más grande, con 129 kb, corresponde a la isla de patogenicidad (IPA), designada como la región *chp/tomA*. La región *chp/tomA* está involucrada en la supresión de la defensa del hospedero y la colonización de la planta por parte de la bacteria. Esto fue demostrado en estudios donde una cepa que sólo poseía el cromosoma era capaz de colonizar plantas de tomate pero sin causar ningún síntoma de marchitamiento (Chalupowicz *et al.*, 2012). Basándose en su estructura, esta región puede dividirse en dos, la región *chp* y la región *tomA*. La región *chp*, tiene un promedio de GC de 64,8 %, con un total de 79 kb. Tiene una capacidad codificante de 45,3 % y se identificaron 11 pseudogenes en esta región. Esta subregión contiene genes codificadores de varias serín-proteasas. En contraste, la región *tomA* tiene un promedio de contenido GC de 66,8% y una alta capacidad codificante (96,3%) y no contiene pseudogenes. En esta subregión, la mayoría de los genes codifican para proteínas que están involucradas en la absorción o el metabolismo de carbohidratos. Contiene genes que codifican para 12 glucosidasas diferentes, un único citocromo P450 y el gen *tomA* (Gartemann *et al.*, 2008). El gen *tomA* codifica para una tomatinasa que actúa sobre la α -tomatina presente en la planta, facilitando la invasión de los tejidos de la planta por parte de *Cmm*. Sin embargo, se encontró que mutantes para el gen *tomA* eran capaces de infectar y crecer normalmente en la planta de tomate y su virulencia no se veía reducida (Kaup *et al.*, 2005). El resto de las regiones con bajo contenido en GC son muy pequeñas y probablemente fueron adquiridas por transferencia horizontal de genes (Gartemann *et al.*, 2008).

Cada uno de los plásmidos de *Cmm*, *pCM1* y *pCM2*, contiene un gen importante para la virulencia del patógeno (*ceIA* y *Pat-1*) (Chalupowicz *et al.*, 2012).

En el plásmido *pCM1* se encuentra el gen *ceIA* que codifica para una endo- β -1,4- glucanasa. Esta proteína cuenta con 746 aminoácidos y un peso molecular de 78 kDa. Su producto génico cuenta con 3 dominios: un dominio N-terminal catalítico glicosil-hidrolasa, un dominio de unión a celulosa y un dominio C-terminal similar a las α - expansinas de plantas. Este último dominio es esencial para el desarrollo de los síntomas de marchitamiento como para la degradación de la celulosa (Gartemann *et al.*, 2008). El gen *ceIA* cuenta con varios repetidos directos e invertidos en la región 5' que pueden tener un rol regulatorio en la expresión génica. Se cree que *ceIA* junto con otras enzimas extracelulares producidas por *Cmm* causan la degradación de las células de la pared de los vasos del xilema, impidiendo el correcto transporte de agua y por ende, el marchitamiento. El plásmido *pCM1* contiene además genes que afectan la colonización y/o la

utilización de nutrientes pero no están directamente involucrados en la inducción de síntomas de marchitamiento en la planta hospedera (Jahr *et al.*, 2000).

Por otra parte, el gen *Pat-1*, que se encuentra en el plásmido pCM2, codifica para una serín-proteasa unida a la pared celular (Gartemann *et al.*, 2008). Esta proteína tiene 280 aminoácidos y un peso molecular de 29,7 kDa. Tanto en el cromosoma de Cmm como en el plásmido pCM2 se encuentran genes homólogos a *Pat-1*. Más específicamente, se encontraron 2 homólogos en el plásmido pCM2 y uno en el cromosoma. Estos homólogos están caracterizados por un contenido GC mucho más bajo que el resto del genoma de Cmm, y además están acompañados por una utilización de los codones diferente que resulta en una expresión débil. Esta información nos permite asumir que *Pat-1* y sus homólogos fueron adquiridos de un organismo diferente probablemente por transferencia horizontal. Tanto el gen *Pat-1* como sus homólogos poseen 6 cisteínas en posiciones conservadas que pueden ser requeridas para la formación de enlaces disulfuro generando una fuerte estructura para la interacción con un sustrato específico presente en la planta hospedera. Sin embargo, hasta el momento no está claro cuál es el rol que juegan *Pat-1* y sus homólogos en la interacción planta-patógeno (Burger *et al.*, 2005).

Una característica a destacar de Cmm es que contiene numerosos genes que codifican para proteasas extracelulares. Al menos 28 serín-proteasas pertenecientes a 3 diferentes familias fueron identificadas. La primera, es la que contiene el conocido factor de patogenicidad, *Pat-1*, y fue designada como la familia Chp y puede ubicarse en la familia de serín-proteasas S1A. *Pat-1* es necesaria para el desarrollo de síntomas tales como el marchitamiento, pero no para la colonización de la planta de tomate (Chalupowicz *et al.*, 2012). La segunda familia de serín proteasas fue designada como la familia Ppa. Existen 11 miembros de esta familia en Cmm, uno de ellos está codificado en el plásmido pCM1, mientras que otros 6 se encuentran en la región chp, y el resto en dos diferentes loci en el cromosoma. La tercera corresponde a la familia de las subtilasas proteasas (Gartemann *et al.*, 2008).

En resumen, la patogenicidad de esta bacteria depende de factores de virulencia presentes en los plásmidos y serín-proteasas codificadas por genes presentes en la isla de patogenicidad chp/tomA (Chalupowicz *et al.*, 2012). La producción de enzimas extracelulares capaces de degradar la pared celular vegetal, tales como la endoglucanasa, pectinmetilesterasa, poligalacturonasa y xilanasa fueron reportadas en Cmm y la actividad endoglucanasa fue reportada como un factor de patogenicidad para esta bacteria (Jahr *et al.*, 2000).

1.3 Interacción planta-patógeno

1.3.1 Mecanismo de infección

Cmm es capaz de censar el nuevo ambiente dentro de la planta hospedera gracias al aumento de la expresión de proteínas responsables de la transducción de señales y así desencadenar una cascada de señales que culminan en la activación de los mecanismos de virulencia y en la inhibición de los mecanismos de defensa de la planta (Savidor *et al.*, 2014). Se identificó un grupo de proteínas que se inducen en presencia de xilema. Estas proteínas corresponden a transportadores y nitroreductasas, lo que indica que la bacteria satisface sus requerimientos metabólicos gracias la utilización de los recursos de la planta (Savidor *et al.*, 2012).

Hasta el momento, se conoce muy poco de la interacción Cmm-hospedero, pero se han propuesto diversas hipótesis para explicar el mecanismo por el cual Cmm induce el marchitamiento en la planta (Gartemann *et al.*, 2003). Como se mencionó anteriormente, la interacción de Cmm con la planta se puede dividir en 2 fases: una fase endofítica y una fase inductora de síntomas. La transición de una fase a la otra ocurre cuando la bacteria alcanza una concentración dentro del xilema igual o superior a 10^8 ufc/g provocando la formación de densos agregados bacterianos en la luz del vaso. Cmm es capaz de formar estructuras *biofilm-like in planta*, al igual que otros patógenos bacterianos vasculares (Figura 1-3). La severidad de la enfermedad causada por Cmm aumenta con la proporción de vasos que el patógeno coloniza, llevando a una capacidad de conducción de agua progresivamente menor. Cmm tiene una clara preferencia por la colonización del protoxilema contra la colonización del metaxilema. Esta característica podría explicar el marchitamiento unilateral observado con Cmm, y puede ser un mecanismo para mantener a la planta viva como fuente nutricional (Chalupowicz *et al.*, 2012).

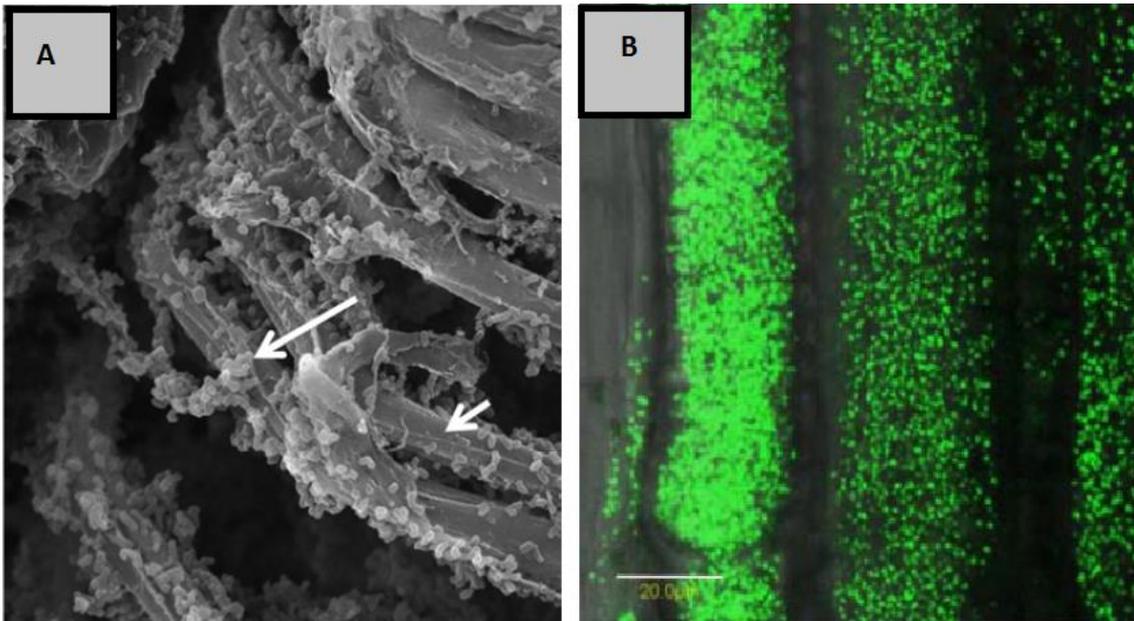


Figura 1-3 Colonización y multiplicación *in planta* de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm): A: Visualización de Cmm en el sistema vascular de plantas de tomate por microscopía electrónica de barrido (A) y por microscopía de laser confocal utilizando una cepa marcada con la proteína verde fluorescente (B). Fuente: Chalupowicz *et al.*, 2012

A su vez, Cmm produce exopolisacáridos (EPS), sin embargo, estos no son considerados un factor de virulencia del patógeno ya que cepas mutantes que contenían cantidades reducidas de EPS no se vieron afectadas en el desarrollo de síntomas o la colonización (Bermphohl *et al.*, 1996; Gartemann *et al.*, 2008; Kaup *et al.*, 2005). Los EPS están involucrados en diversas funciones como la protección contra la desecación, la captura de cationes, la adhesión a las superficies y las interacciones con el hospedero (Gartemann *et al.*, 2008). La producción de exopolisacáridos (EPS) puede ser un factor prominente que contribuye al taponamiento de los vasos del xilema. EPS genera una matriz alrededor de la bacteria como protección contra la deshidratación y al estar cargados pueden actuar como intercambiadores de iones, concentrando minerales y nutrientes alrededor de la bacteria así como proteger a la misma atrapando componentes tóxicos. Particularmente, en el contexto de interacciones entre bacteria y plantas, EPS puede prevenir el reconocimiento de la bacteria por parte de los mecanismos de defensa de la planta (Gartemann *et al.*, 2003).

1.3.2 Mecanismos de defensa vegetal

Como parte del mecanismo de defensa de la planta contra patógenos, las plantas cuentan con la detección de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), vía receptores de membrana (PRR). Este reconocimiento inicia una cascada de señalización que desencadena la respuesta basal de defensa de la

planta. Esta respuesta incluye la inducción de muchos genes relacionados con la defensa, el engrosamiento de la pared celular, la alcalinización del medio extracelular, el aumento de la producción de etileno y de especies reactivas al oxígeno (ROS) (Cui *et al.*, 2015; Spoel y Dong, 2012). Para ser virulentos, los patógenos deben ser capaces de superar esta inmunidad activada por PAMPs (PTI), y así suprimir la defensa de la planta (Savidor *et al.*, 2012). Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado en profundidad los PAMPs de Cmm y los PRR de la planta de tomate. Según Balaji *et al.* (2008), los posibles PAMPs que posee Cmm son proteínas de choque térmico, componentes de la pared celular, EPS o numerosas enzimas extracelulares que degradan la pared celular y sus productos de hidrólisis (Balaji *et al.*, 2008). Sin embargo, estos PAMPs no fueron verificados experimentalmente, como sí lo fueron otros PAMPs descritos en otras bacterias patógenas como ser la flagelina o el factor de elongación Tu (Jacques *et al.*, 2016)

En particular, en el caso de la planta de tomate y Cmm, una vez que la planta de tomate detecta la presencia del patógeno, esta desencadena el aumento en la expresión de muchas proteínas. Unas de las proteínas más abundantes durante la infección por Cmm son las enzimas involucradas en el metabolismo de la metionina y la biosíntesis del etileno. La síntesis del etileno a partir de la metionina involucra la acción consecutiva de 3 enzimas: ADS (S-adenosilmetionina sintetasa), ACS (aminociclopropano-1-carboxilato sintetasa) y ACO (aminociclopropano-1-carboxilato oxidasa). Esta síntesis es importante para el desarrollo de síntomas en la planta. La enzima ACO cataliza el último paso de la síntesis de etileno y se ve inducida en plantas infectadas, mientras que las otras enzimas permanecen en constante abundancia, a pesar de la presencia de Cmm (Savidor *et al.*, 2012). La síntesis de etileno en estadios tempranos de la infección está localizada y restringida a las células que rodean los vasos del xilema donde Cmm prolifera, mientras que más adelante en el desarrollo de la infección, la maceración de las células parenquimáticas estimulan la producción generalizada de etileno también en otros tejidos (Balaji *et al.*, 2008).

Algunas proteínas asociadas con la defensa de la planta también son reprimidas por la infección con Cmm. Este es el caso de las peroxidasas de clase III, las cuales están involucradas en procesos que incluyen la producción de lignina, la cicatrización de heridas y la defensa contra patógenos. La regulación negativa de estas proteínas puede estar reflejando una inhibición activa por parte de Cmm, la cual estaría interfiriendo con los mecanismos de defensa de la planta (Savidor *et al.*, 2012).

1.4 Diversidad genética de Cmm

El conocimiento de la estructura genética de las poblaciones de Cmm de cada país es importante para definir los riesgos de introducción de nuevas cepas de este patógeno en cada región, para establecer reglamentaciones cuarentenarias y estrategias eficientes para el control del cancro bacteriano (De León *et al.*, 2009).

Se han realizado varios estudios sobre la variabilidad genética de Cmm en diferentes regiones productoras de tomate a nivel mundial encontrando que existe una alta diversidad de dicho patógeno, lo que concuerda con el hecho de que el patógeno ingresa a las regiones productoras de tomate por diversos orígenes (Kawaguchi y Tanina, 2014; De León *et al.*, 2009; Tancos *et al.*, 2015). Para la detección de esta variabilidad genética se utilizaron diversos métodos. El grupo de De León *et al.* (2009) ensayó los métodos de RAPD-PCR, PCR-RFLP, rep-PCR y AFLP. Se encontró que los protocolos de RAPD y AFLP son adecuados para la caracterización de la diversidad de Cmm en estudios epidemiológicos. Por otra parte, Kawaguchi y Tanina (2014) estudiaron la diversidad genética presente en Japón utilizando ISSR-PCR y rep-PCR encontrando una alta diversidad genética. Sin embargo, actualmente el método más recomendado se conoce como *Multilocus Sequence Typing* (MLST), donde 5-10 genes *housekeeping* son amplificados por PCR y luego secuenciados (Maiden *et al.*, 1998). Los genes *housekeeping* están presentes en todas las cepas de una especie, y mutaciones en estos genes ocurren raramente, con lo cual este método permite la detección de polimorfismos entre aislados. Una vez obtenidas las secuencias, se las compara y a cada secuencia única de un gen se le asigna un número arbitrario de alelo, y la combinación de estos números para cada aislado define la variante alélica (ST). Una vez obtenido cada ST, es posible la construcción de un árbol filogenético (Jacques *et al.*, 2012; Milijašević-Marčić *et al.*, 2012). En Nueva York, este método fue utilizado permitiendo agrupar 51 aislados en 21 haplotipos (Tancos *et al.*, 2015).

1.5 Antecedentes en Uruguay

1.5.1 Producción de tomate en Uruguay

En Uruguay, la mayoría de las semillas de tomate son importadas cada año de diversas compañías que tienen sus centros de producción en diferentes países, como ser EE.UU, Francia, Tailandia, Italia y China. Cmm no es considerado un patógeno cuarentenario en Uruguay por lo que no se realiza ningún control fitosanitario al material que ingresa al país (Croce *et al.*, 2016).

El tomate representa el segundo cultivo hortícola en términos de volumen físico y económico de la producción en el país. El tomate para consumo en fresco se cultiva tanto a campo como protegido. Los cultivos protegidos están presentes en dos zonas de producción (Zona Sur y Zona Norte). Los cultivos en campo están presentes principalmente en la Zona Sur, son cultivos de estación y su producción se da durante la zafra de verano – otoño. En los años 2014/2015, la Zona Sur aportó 3818 toneladas de tomate de mesa y 2938 toneladas de tomate perita producidos en campo. A su vez, aportó 8537 toneladas de tomate de mesa provenientes de cultivos protegidos. Por otra parte, en la Zona Norte, la producción es mayoritariamente en cultivos protegidos, y en los años 2014/2015 se produjeron 19942 toneladas de tomate, con un rendimiento de 12,8 kg/m² (Figura 1-4) (MGAP-DIEA, 2016).

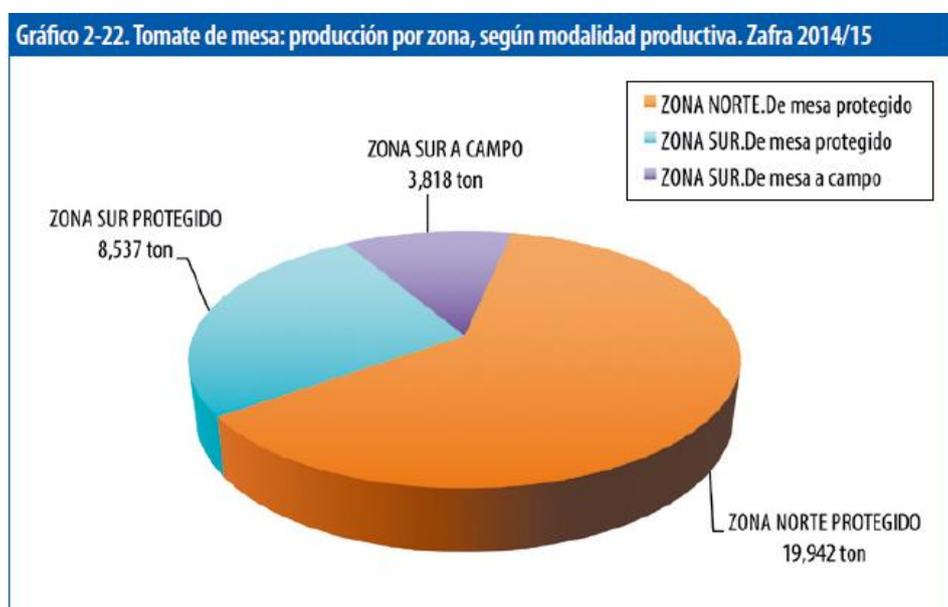


Figura 1-4 Producción de tomate de mesa por zona, según modalidad productiva. Fuente: MGAP/ DIEA, 2016

1.5.3 Estudios previos

El cancro bacteriano representa uno de los principales problemas sanitarios que afectan al cultivo de tomate en Uruguay y en los últimos años se han llevado a cabo trabajos de investigación en relación a esta problemática. En el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) se han realizado estudios epidemiológicos sobre la sobrevivencia y transmisión de Cmm en condiciones de invernadero, se han evaluado algunas estrategias de control del patógeno como la aplicación de productos cúpricos sobre el follaje y en riego, uso de desinfectantes sobre tijeras de poda, así como métodos de desinfección de semillas (Maeso *et al.*, 2015a; Maeso *et al.*, 2015b; Maeso y Walasek, 2012)

Por otro lado, nuestro grupo de investigación en el Laboratorio de Microbiología Molecular de Facultad de Química, desde el año 2011 ha comenzado a trabajar en este tema en colaboración con INIA y la Facultad de Agronomía. Se trabajó en el desarrollo de métodos de diagnóstico molecular de Cmm para la detección del patógeno en diferentes tipos de muestras que contribuyen a su diseminación (semillas, plantas asintomáticas) (Croce, 2016). Se evaluaron diferentes metodologías y se optimizó un método basado en BIO-multiplex qPCR capaz de detectar al patógeno con una muy buena especificidad y sensibilidad (una semilla infectada en un lote de 2000 semillas sanas) (Croce, 2016). Por otra parte, se realizó el primer relevamiento de las cepas de Cmm presentes en nuestro país, generando una colección de 54 cepas aisladas de plantas de tomate con síntomas de cancro bacteriano en las diferentes regiones de producción de tomate. Las cepas fueron identificadas por diferentes métodos moleculares y se verificó en todos los casos la presencia de los principales genes de patogenicidad de Cmm codificados tanto en la isla de patogenicidad como en los plásmidos pCM1 y pCM2 (*chpC*, *tomA*, *ppaA*, *pat1* y *celA*).

Asimismo, se evaluó la diversidad genética de esta colección mediante la técnica MLST, utilizando el esquema reportado por Jacques et al. (2012) (Croce et al., 2016). Se utilizaron los genes *atpD*, *gyrB*, *dnaK*, *ppk* y *recA* y se compararon los aislados uruguayos con otros obtenidos en diferentes partes de mundo y en distintos años. Los 54 aislados fueron agrupados en 12 variantes alélicas (STs), mostrando una alta diversidad de cepas de Cmm que afectan al cultivo de tomate en Uruguay. En la Figura 1-5 se muestra el árbol filogenético resultante de la concatenación de los 5 genes. Se agregó a su vez, la cepa de referencia Cmm NCPPB382 y la cepa CFBP3559 correspondiente a *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* para la realización del árbol. Los resultados obtenidos indican que los STs identificados no presentan relación con el origen geográfico ni temporal de los aislados.

La diversidad genética encontrada en el país fue alta. La mayoría (10 STs) de los aislados uruguayos fueron identificados como cepas “nuevas” ya que sus correspondientes variantes alélicas no habían sido previamente identificados en otras partes del mundo. Esto puede deberse a que en la colección de cepas de otros países evaluada no están representados dichos STs, o que dicha diversificación ocurrió luego de la introducción del patógeno en Uruguay (Croce, 2016).

Estos hallazgos son de mucha utilidad, pero quedan aún pendientes varios aspectos a profundizar respecto a este tema. Por ejemplo, el muestreo a realizar en campo, sobre qué parte de la planta realizar la detección, entre otros. Asimismo,

sería de gran utilidad saber si existen diferencias en el nivel de agresividad, sobrevivencia en restos vegetales y otras características fenotípicas de relevancia para el manejo de la enfermedad.

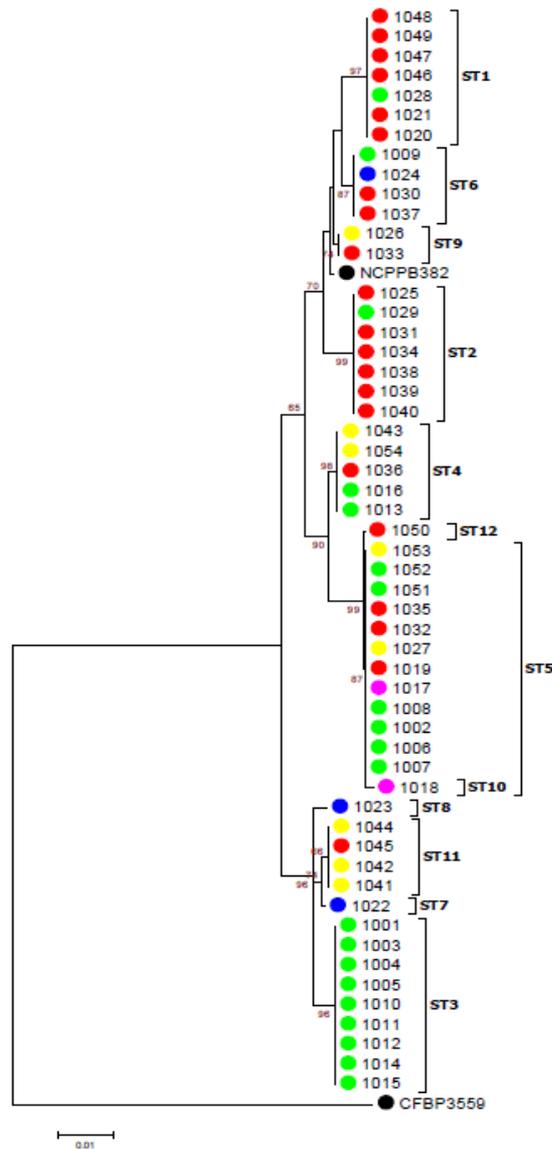


Figura 1-5. Árbol filogenético basado en la concatenación de las secuencias parciales de los genes (*atpD*, *gyrB*, *dnaK*, *ppk* y *recA*) representando todas las cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aisladas en Uruguay. En cada nodo se muestran los valores de bootstrap superiores al 50%, y en cada cluster se indica con cuál ST fue identificado. Los aislados provenientes de distintos departamentos están marcados con distinto color: Salto (verde), Artigas (azul), Montevideo (rojo), Canelones (amarillo) y San José (fucsia). Fuente: Croce, 2016.

1.6 Hipótesis de trabajo

La variabilidad genética encontrada en las cepas de Cmm aisladas en Uruguay podría correlacionarse con el grado de patogenicidad u otros aspectos fenotípicos de las mismas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos generales

Evaluar la existencia de diferencias fenotípicas a nivel de virulencia entre 12 variantes alélicas (STs) de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) encontrados en Uruguay.

2.2 Objetivos específicos

Los objetivos específicos abarcan la realización de estudios comparativos entre 12 STs de Cmm en relación a diferentes aspectos vinculados a la virulencia del patógeno, incluyendo determinar:

- i) la agresividad en tomate mediante evaluación de síntomas
- ii) la capacidad de multiplicación del patógeno *in planta*
- iii) la capacidad de producción de *biofilm*

2.3 Estrategia de trabajo

En el presente trabajo, se utilizaron cepas representativas de los 12 STs de Cmm encontrados en Uruguay provenientes de diferentes zonas de producción (Croce, 2016). Por un lado, se evaluó la agresividad de las cepas sobre plantas de tomate mediante ensayos clásicos de inoculación en condiciones controladas y seguimiento diario de los síntomas típicos de la enfermedad (marchitamiento unilateral y cancro en el tallo). Por otro lado, se evaluó el potencial patogénico de las cepas en función de su capacidad de multiplicación en plantas de tomate inoculadas. La metodología elegida fue la cuantificación absoluta de Cmm *in planta* mediante PCR a tiempo real (qPCR). La qPCR es un método rápido, específico y sensible que permite hacer la cuantificación del ADN blanco en distintos tipos de muestras. A su vez, la utilización de un sistema *primers*-sonda Taqman asegura una mayor especificidad de detección que otras tecnologías disponibles. Se evaluaron dos sistemas de *primers*-sonda Taqman para determinar el más sensible para la cuantificación *in planta* (Costa, 2004). En primer lugar, se verificó que las sustancias provenientes de los tejidos vegetales coextraídas con el ADN de Cmm no inhibieran la amplificación e interfirieran con la cuantificación absoluta. Además, utilizando una única cepa de Cmm, se determinó un tiempo post-inoculación óptimo para la realización del análisis comparativo de la multiplicación *in planta* de los 12 STs. Por su parte, todas las muestras cuantificadas por qPCR, también fueron analizadas por un método microbiológico clásico de cuantificación (recuento en microgota) a los efectos de comparar ambas metodologías. Finalmente, se estudió la capacidad de formación de biofilm por ser uno de los principales factores

de virulencia descritos para Cmm. Para ello, se utilizó un ensayo en placas de microtitulación y tinción con cristal violeta, en base a la metodología propuesta por O'Toole (2011). Se evaluaron diversos medios de cultivo y condiciones de incubación para llegar a las condiciones óptimas para verificar la producción de biofilm en las diferentes cepas de Cmm.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento

Se seleccionaron cepas representativas de los 12 STs encontrados en Uruguay (Croce, 2016). Estas cepas fueron aisladas de distintas regiones del país a partir de plantas de tomate con síntomas de infección por Cmm. En la tabla 3-1 se muestra en detalle la información correspondiente a la cepa seleccionada para cada ST. En la Figura 1-5 se muestra el árbol filogenético representando la diversidad genética de las cepas de Cmm presentes en Uruguay, obtenido mediante el método *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA).

Tabla 3-1. Origen de las cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* utilizadas en este trabajo.

Variante alélica (ST)	Cepa	Origen	Año
ST 1	MAI 1048	Montevideo	2014
ST 2	MAI 1031	Montevideo	2010
ST 3	MAI 1001	Salto	2012
ST 4	MAI 1043	Canelones	2014
ST 5	MAI 1051	Salto	2014
ST 6	MAI 1009	Salto	2012
ST 7	MAI 1022	Artigas	1997
ST 8	MAI 1023	Artigas	1997
ST 9	MAI 1026	Canelones	1999
ST 10	MAI 1018	San José	2012
ST 11	MAI 1044	Canelones	2014
ST 12	MAI 1050	Montevideo	2014

Cada cepa se nombrará con el número de ST.

Las cepas puras se conservaron en 15% de glicerol estéril en freezer a -70°C (Schaad, 2001). Previo a la realización de cada ensayo, se realizó el descongelado de las cepas y aislamiento por estrías en medio agar nutriente-extracto de levadura (NBY), incubando las placas en estufa a 28°C durante 48-72 horas. Para la preparación de cultivos líquidos se partió de colonias aisladas, se subcultivó en tubos con medio líquido NBY y se incubaron a 28°C durante 48 horas con una agitación de 150 rpm. Para el aislamiento de Cmm a partir de plantas de tomate infectadas se utilizó un medio de cultivo selectivo SCM (Schaad, 2001). La composición y forma de preparación de cada medio se detalla en el *Apéndice*.

3.2 Inoculación de plántulas de tomate

Las plántulas de tomate fueron obtenidas a partir de semillas de dos variedades: Elpida y una proveniente de Tailandia. Estas semillas fueron sembradas en almacigueras con sustrato hortícola comercial (Tref, Jiffy Products International, Holanda) y se mantuvieron en cámara de crecimiento bajo condiciones controladas (24 °C, un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, y aproximadamente 80% de humedad). Luego de 2-3 semanas las plántulas se trasplantaron a macetas individuales y se mantuvieron en las mismas condiciones por 3-4 semanas más hasta su inoculación.

Para la preparación del inóculo se partió de un cultivo bacteriano de 48 horas en caldo NBY, el cual se centrifugó por 3 minutos a 8000 rpm, resuspendiendo el pellet en agua estéril para eliminar los restos de medio de cultivo. Este inóculo se ajustó espectrofotométricamente a una concentración de 10^8 células/mL (densidad óptica a 600 nm entre 0,14-0,18). Para confirmar la concentración del inóculo se realizó un recuento por microgota en medio NBY (ver sección 3.3).

Para la inoculación se realizó una herida con aguja estéril en el pecíolo correspondiente a la primera hoja verdadera y luego se colocaron 5 μ L de la suspensión del patógeno previamente ajustada. La figura 3-1 muestra el procedimiento de inoculación.



Figura 3-1. Procedimiento de inoculación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en plántulas de tomate.

3.3 Evaluación de agresividad en tomate

Se evaluó la capacidad de las cepas de Cmm de inducir síntomas de marchitamiento en plántulas de tomate. Para esto, se inocularon 4 plántulas de la variedad Tailandia por cepa y 4 controles negativos (plantas inoculadas con agua

estéril). En este caso, la presencia de controles negativos nos permitió discriminar el daño obtenido por la herida realizada para la inoculación.

Se realizó un seguimiento diario de cada una de las plántulas inoculadas, registrando en primera instancia la aparición del primer síntoma, y luego la evolución de la enfermedad a través de la evaluación de la proporción de hojas enfermas en función de las totales (expresado en porcentaje). Se consideró a cada hoja compuesta como una hoja.

Los datos obtenidos fueron analizados en el programa Origin versión 8.0. Este programa permite graficar para cada cepa la evolución de la enfermedad en función del tiempo. La curva obtenida, nos permitió mediante la integración de los valores, calcular el área bajo la curva de progresión de la enfermedad (ABCPE). (Ling *et al.*, 2017; Yeh, 2002)

3.4 Cuantificación de Cmm por recuento en microgota

Este método es una variante del método tradicional de recuento en placa por siembra en superficie (100 μ l), que se ensayó por tener la capacidad de sembrar múltiples diluciones en una misma placa. Por esta razón es especialmente indicado para los casos en que la concentración de la muestra problema es desconocida, permitiendo sembrar diferentes diluciones sin tener un gasto excesivo de placas de Petri (Strahsburger *et al.*, 2016). En una primera instancia se realizaron ambas metodologías en paralelo, lo que permitió verificar la reproducibilidad y exactitud del método elegido.

El recuento en microgota se realizó para confirmar la concentración de los inóculos y determinar la concentración de Cmm in planta. En esta metodología, la placa se dividió en cuatro, y se sembraron 20 μ L de cada dilución en cada cuadrante. La placa se dejó secar semi-tapada en flujo laminar durante aproximadamente 30 minutos para evitar que la gota se disperse por la placa.

Para confirmar la concentración de los inóculos, previamente estandarizados por medida de absorbancia a 600 nm, el recuento se realizó en una placa de NBY y se sembraron las diluciones seriadas al décimo -3, -4, -5 y -6 (realizadas en agua destilada estéril). La placa fue incubada en estufa a 28 °C durante 72 horas.

Para determinar la concentración de Cmm in planta, un fragmento de tallo de cada plántula de tomate fue colocado en 1 mL de agua estéril y macerado dentro de un tubo eppendorf. Luego, se realizaron las diluciones correspondientes para sembrar en placas de medio selectivo SCM. Las diluciones sembradas se

informarán para cada ensayo. En este caso, la incubación se realizó durante 7 días a 28 °C.

Para informar el recuento en microgota, se eligió la dilución donde es posible contar entre 10 y 50 colonias y el valor de ufc/mL correspondiente se calculó mediante el producto del número de colonias por la inversa de la dilución y por la inversa del volumen sembrado.

Una vez obtenido el resultado de ufc/mL y conociendo el peso del tallo utilizado (0,1 g) se calculó la cantidad de unidades formadoras de colonia por gramo.

3.5 Optimización de un procedimiento para la cuantificación de Cmm *in planta* mediante qPCR

Para llevar a cabo la cuantificación de Cmm por qPCR se siguieron las siguientes etapas: obtención de estándares de ADN genómico de Cmm para poder realizar una curva de calibración; selección del sistema de primers-sonda; evaluación de métodos de extracción de ADN de Cmm a partir de plantas infectadas; y la evaluación del efecto matriz.

3.5.1 Extracción de ADN genómico de Cmm

Para la realización de estándares de ADN genómico de Cmm se utilizó un método de extracción clásico (Croce, 2012). El procedimiento seguido se basa en el descrito por Sambrook y Rusell (2001). Se partió de 5 mL de cultivo líquido en caldo NBY (crecido durante 48 horas a 28 °C en agitación a 150 rpm), se centrifugó durante 10 minutos a 8000 rpm y se descartó el sobrenadante que contiene los restos de medio de cultivo. El *pellet* se congeló a -20 °C durante 15-60 minutos y se resuspendió en 0,5 mL de *buffer* TE25S. Posteriormente, se agregaron 10 µL de una solución de lisozima (100 mg/mL en *buffer* TE25S) y se incubaron a 37 °C durante 30-60 minutos. Se agregaron 5 µL de la solución de proteinasa K (20 mg/mL en agua), 30 µL de 10% SDS y se mezcló suavemente por inversión. Se incubó durante 60 minutos a 55 °C. Luego de la incubación, se agregaron 100 µL de NaCl 5M y 65 µL de CTAB/NaCl, se mezcló vigorosamente y se incubó durante 10 minutos a 55 °C. Se enfrió a 37 °C durante unos minutos, se agregaron 500µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se agitó durante 30 minutos. Pasados los 30 minutos, se centrifugó la muestra durante 15 minutos a 12500 rpm. Se transfirió la fase acuosa a un *ependorf* nuevo, se agregaron 2,5 µL de ARNasa A

libre de DNAasa (10 mg/mL) y se incubó a 37°C durante 15 minutos. Posteriormente, se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, y se lavó el *pellet* con etanol 70 %. Luego del lavado, se secó el *pellet* de ADN y se resuspendió en 50 µL de agua MQ.

La integridad del ADN extraído se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X y tinción con *Good View (Ecoli s.r.o, Bratislava, Eslovaquia)*. Posteriormente, se realizó su cuantificación mediante espectrofotometría (A_{260nm}) en un equipo Nanodrop ND-100 (*Nanodrop Technologies*). La concentración se ajustó a 10 ng/µL y se conservó a -20°C hasta su uso. Se realizaron diluciones seriadas al décimo de los ADN de Cmm obtenidos en agua estéril o en matriz vegetal con el fin de obtener estándares para la posterior realización de una curva de calibración.

3.5.2 Materiales y condiciones de amplificación

Se evaluaron dos sistemas de primers y sonda de hidrólisis TaqMan® para el seguimiento y cuantificación de Cmm in planta mediante qPCR. Uno de ellos es el sistema Ptssk (Putative Two-component System Sensor Kinase) (Berendsen et al., 2011) y el otro es el sistema MVS21 (ISF, 2015). El primer sistema genera un amplicón de 132 pb mientras que el segundo uno de 83 pb.

Para ambos sistemas se utilizaron las mismas concentraciones de reactivos especificadas en la Tabla 3-2.

Tabla 3-2. Concentraciones de reactivos para la cuantificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por qPCR.

Componentes	Concentración final	Volumen (µL)
Mastermix 2X QuantiNova™	1X	5
Primer F (3.13 µM)	0,5 µM	1,6
Primer R (3.13 µM)	0,5 µM	1,6
Sonda (3.13 µM)	0,25 µM	0,8
ADN	-	1
Volumen final	-	10

Las reacciones fueron llevadas a cabo en un equipo Rotor-Gene 6000 (Qiagen) y las condiciones del ciclo fueron las establecidas por el Kit de QuantiNova™. (Tabla 3-3).

Tabla 3-3. Condiciones de amplificación utilizadas para la cuantificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por qPCR.

40 ciclos			
Etapa	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Hibridación-Extensión
Temperatura	95 °C	95 °C	60 °C
Tiempo	2 min	5 seg	5 seg

Todas las muestras se analizaron por duplicado (réplicas técnicas) y en cada corrida se incluyeron controles positivos (ADN genómico de Cmm) y blancos de reacción sin ADN.

3.5.3 Análisis de datos

El análisis de datos se realizó mediante el Software Rotor-Gene 6000 versión 1.7. Los resultados se registraron en base a los valores de ciclo de cuantificación (Cq), que corresponde al ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia con respecto a la señal de base. El Cq obtenido es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en una muestra problema (Costa, 2004). Previamente, se fijó de forma manual un umbral (en este caso se fijó en 0,02) en el punto de inflexión de la curva de fluorescencia en función de los ciclos, teniendo en cuenta el ruido de fondo y los blancos de reacción.

Para realizar la cuantificación absoluta mediante qPCR, es necesaria la construcción de una curva de calibración con estándares de concentración conocida. En este trabajo, los estándares fueron obtenidos a partir de diluciones seriadas al décimo de ADN genómico de Cmm (ver ítem 3.5.1) en agua estéril o en matriz vegetal. Estos estándares fueron alicuotados para evitar los sucesivos ciclos de congelamiento y conservados a -20 °C. Se expresó la concentración de los estándares como equivalentes genómicos/μL (eg/μL), realizando la conversión de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{eg}/\mu\text{L} = \frac{\text{ng}/\mu\text{L} \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{pb} \times 1 \times 10^9 \times 660}$$

Para el cálculo se tuvo en cuenta el tamaño del genoma de Cmm (3,4 x 106 pb) (Gartemann et al., 2008), y el peso molecular promedio de un par de bases (660 g/mol). Esta fórmula asume que la secuencia amplificada se encuentra en

copia única en el genoma de Cmm, que es el caso en ambos sistemas evaluados (Ptssk y MVS21).

Las concentraciones evaluadas fueron: $1,9 \times 10^6$ eg/ μ L, $1,9 \times 10^5$ eg/ μ L, $1,9 \times 10^4$ eg/ μ L, $1,9 \times 10^3$ eg/ μ L, $1,9 \times 10^2$ eg/ μ L, $1,9 \times 10^1$ eg/ μ L y 1,9 eg/ μ L. En cada corrida los estándares fueron evaluados por duplicado, y se utilizaron blancos de reacción sin ADN. Mediante qPCR se obtuvieron gráficos de fluorescencia vs número de ciclos (Cq) para los diferentes estándares evaluados. Se determinó el ciclo de corte de cada estándar, y con los valores obtenidos se construyó una curva de calibración. De la curva de calibración obtenida se evaluó la eficiencia de amplificación, el límite de detección y el rango lineal de cuantificación.

3.5.4 Evaluación de métodos de extracción de ADN de Cmm a partir de plántulas de tomate infectadas

Se evaluaron diferentes métodos con el fin de determinar el más adecuado para su posterior utilización para la evaluación de la multiplicación *in planta* de los 12 STs de Cmm.

Para seleccionar el método de extracción se inocularon plantas de tomate como se describe en la sección 3.2, y luego de 2 días se tomaron muestras de tallo de aproximadamente 1 cm justo por encima de la hoja inoculada. El peso final aproximado de tallo para cada ensayo fue de 0,1 g. Como control negativo se analizaron por el mismo procedimiento plantas de tomate inoculadas con agua estéril. Se analizaron como mínimo 3 plantas por cada método evaluado.

Los métodos ensayados fueron: la extracción con el buffer TRIsure (Bioline) y dos kits comerciales de Invitrogen (Charge Switch y PureLink™ Plant). En cada caso se siguieron las instrucciones de los proveedores correspondientes.

3.5.5 Evaluación del efecto matriz

Se evaluó la ocurrencia de inhibición de la qPCR debido a componentes de la matriz vegetal. Para ello, se construyó una nueva curva de calibración de ADN de Cmm pero utilizando matriz (ADN extraído a partir de plantas de tomate sanas no inoculadas) como diluyente en lugar de agua. El rango de concentraciones de esta curva fue el siguiente: $4,4 \times 10^6$ eg/ μ L, $4,4 \times 10^5$ eg/ μ L, $4,4 \times 10^4$ eg/ μ L, $4,4 \times 10^3$ eg/ μ L, $4,4 \times 10^2$ eg/ μ L, $4,4 \times 10^1$ eg/ μ L y 4,4 eg/ μ L. Esta matriz fue obtenida mediante extracción de ADN utilizando el protocolo de PureLink™ Plant.

Ambas curvas de calibración se evaluaron en función de los parámetros de eficiencia obtenidos, límite de detección y rango de cuantificación.

3.6 Seguimiento del proceso de infección de Cmm en plantas de tomate inoculadas

En primer lugar, se procedió a realizar el seguimiento de la multiplicación de Cmm *in planta* a diferentes tiempos luego de la inoculación. Para este ensayo se utilizó la cepa correspondiente al ST 6. Se inocularon un total de 12 plántulas de tomate de la variedad Elpida siguiendo el protocolo descrito en el ítem 3.2. Se tomaron muestras de tallo de aproximadamente 2 cm. Dicho fragmento de tallo fue dividido en dos partes exactas, una de ellas fue utilizada para la cuantificación de Cmm mediante recuento en microgota (Ver sección 3.4), y la otra para la extracción de ADN y cuantificación de Cmm mediante qPCR. El peso final aproximado de tallo para cada ensayo fue de 0,1 g. Se realizaron extracciones de ADN utilizando el kit PureLink™ Plant a diferentes tiempos post-inoculación (dpi): 2 dpi, 5 dpi, 9 dpi y 12 dpi. Para cada tiempo, se analizaron tres réplicas biológicas y un único control negativo (planta inoculada con agua estéril).

Para la cuantificación de Cmm, se realizó una qPCR de los ADN obtenidos junto con una curva de calibración en matriz vegetal, utilizando el procedimiento descrito en el punto 3.5.3. Los resultados de qPCR se calcularon en equivalentes genómicos/ μ L y se convirtieron a eg/g teniendo en cuenta el peso de las muestras de tallo obtenidas.

A su vez, se realizaron recuentos en microgota (ítem 3.4) con el fin de correlacionar con los resultados obtenidos por qPCR. Las diluciones sembradas en los recuentos para cada tiempo se especifican en la tabla 3-4.

Tabla 3-4. Diluciones sembradas para el recuento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en plantas de tomate inoculadas a diferentes tiempos luego de la inoculación

Días post inoculación (dpi)	Diluciones sembradas
2	(-1) (-2) (-3) y (-4)
5	(-2) (-3) (-4) y (-5)
9	(-3) (-4) (-5) y (-6)
12	(-5) (-6) (-7) y (-8)

Los resultados de este experimento fueron utilizados para determinar un tiempo post-inoculación óptimo para el posterior análisis comparativo de los 12 STs.

3.7 Análisis comparativo de la multiplicación en planta de los 12 STs de Cmm

Para evaluar la capacidad de multiplicación en planta de los 12 STs de Cmm, se inocularon en tallo para cada cepa cuatro plantas de tomate de la variedad Tailandia (réplicas biológicas). También se incluyeron cuatro controles negativos (plantas inoculadas con agua estéril). En este caso, la extracción de ADN se realizó a los 3 dpi, y se cuantificó al patógeno por qPCR siguiendo el procedimiento descrito anteriormente utilizando la curva de calibración realizada con matriz de planta y por recuento en microgota como se menciona en el ítem 3.6. Se sembraron las diluciones (-2), (-3), (-4) y (-5).

3.8 Evaluación de la capacidad de producción de biofilm

3.8.1 Evaluación de condiciones para la realización del ensayo de biofilm

El protocolo para la evaluación de la capacidad de producción de biofilm por los 12 STs de Cmm se basa en el detallado por O' Toole (2011). Se partió de 5 mL de cultivo líquido en caldo NBY (crecido durante 48 horas a 28°C en agitación a 150 rpm).

Se evaluaron en primera instancia distintos medios de cultivo con el fin de determinar el que permitiera mayor producción de biofilm por parte de las cepas de Cmm. Se evaluó un medio nutriente (NBY), y diversos medios mínimos: XMM, M9 y M9 suplementado con 1% de glucosa (la composición de cada medio se detalla en el Apéndice).

En el caso de la utilización de un medio mínimo, dicho cultivo se centrifugó durante 3 minutos a 8000 rpm. Se descartó el sobrenadante que contiene los restos de medio de cultivo y se resuspendió el *pellet* en agua estéril. Se tomó el volumen necesario de este inóculo para llegar a una densidad óptica (DO) de 0,2 en un matraz que contiene 10 mL del medio mínimo seleccionado. Este matraz se incubó durante 72 horas a 28°C en agitación a 150 rpm. Una vez culminado este tiempo, se preparó una dilución 1:10 y 1:100 en el medio mínimo a evaluar y se agregaron por duplicado 1 mL por pocillo en una placa de 24 pocillos, junto con controles negativos (medio mínimo fresco sin inóculo). Esta placa se incubó durante 7 días.

En el caso de la utilización de un medio nutriente, se preparó la dilución 1:10 y 1:100 del cultivo líquido en caldo NBY incubado durante 48 horas para agregar 1mL por duplicado en la placa de 24 pocillos. Esta placa se incubó durante 72 horas.

Una vez finalizado el tiempo de incubación de la placa, se midió la absorbancia a 600 nm de la misma en un lector de placas para verificar el crecimiento de la bacteria en los pocillos. Luego, se descartó el contenido de los pocillos y se lavó 3 veces sumergiendo la placa en un recipiente con agua destilada. Se retiró el exceso de agua y se fijó durante 20 minutos a 60°C. Se agregaron 500 µL de cristal violeta 0,1% en cada pocillo y se dejó incubando durante 15 minutos a temperatura ambiente. Finalizado el tiempo, se descartó el contenido de los pocillos y se lavó 3 veces sumergiendo la placa en un recipiente con agua destilada. Se dejó secando la placa sobre papel durante 24 horas. Finalmente, se agregaron 500 µL de etanol 95% y se midió nuevamente la absorbancia a 600 nm para la cuantificación.

3.8.2 Análisis comparativo de la capacidad de producir biofilm de los 12 STs de Cmm

Para el análisis comparativo, se seleccionó el medio mínimo M9 suplementado con 1% de glucosa, cuya composición se detalla en el *Apéndice*, y se utilizó la dilución 1:10 del cultivo en matraz incubado durante 72 horas a 28°C a 150 rpm. Se realizaron 4 réplicas por cepa (4 pocillos de la placa de 24 pocillos por cepa). Se siguió el protocolo detallado en el ítem 3.8.1.

Los resultados se expresaron como absorbancia relativa (Abs_{600nm} post-revelado/ Abs_{600nm} pre-revelado).

3.9 Análisis estadísticos

Los resultados de cuantificación de Cmm *in planta*, (eg/g y ufc/g), agresividad (ABCPE y tiempo de aparición del primer síntoma) y producción de biofilm (absorbancia relativa) se analizaron estadísticamente para evaluar si existen diferencias significativas entre las diferentes cepas evaluadas.

Para cada análisis, se calculó la desviación y el error estándar entre las réplicas biológicas de la siguiente forma;

$$\text{Error estándar} = \text{Desviación estándar} / \sqrt{n},$$

siendo n el número de réplicas biológicas utilizadas para cada ensayo realizado.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA), utilizando un nivel de significancia de 0,05. Cuando se encontraron diferencias significativas entre las cepas se realizó un test de comparaciones múltiples utilizando el índice de Tukey. En cada análisis se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de los errores experimentales. Estos análisis se realizaron en el software Infostat (Di Rienzo, 2016).

4. RESULTADOS

4.1 Evaluación de agresividad en tomate

La evaluación de la agresividad en tomate se realizó con el fin de comparar la capacidad de los 12 STs de inducir los síntomas típicos del cancro bacteriano. Este ensayo se llevó a cabo como se menciona en el ítem 3.3. Tanto la aparición del primer síntoma como la evolución de la enfermedad en planta fueron consideradas como criterios para evaluar la agresividad de los STs.

Para este ensayo, se ajustaron espectrofotométricamente los inóculos iniciales para cada cepa, y en la Tabla 4-1 se muestran los valores de concentración de dichos inóculos verificados por recuento en microgota.

Tabla 4-1. Concentración de los inóculos de cada cepa de Cmm obtenidos mediante recuento en microgota.

Cepa (ST)	Recuento en microgota (ufc/mL)
ST 1	$7,0 \times 10^7$
ST 2	$1,4 \times 10^9$
ST 3	$1,7 \times 10^8$
ST 4	$1,2 \times 10^8$
ST 5	$1,3 \times 10^8$
ST 6	$1,3 \times 10^8$
ST 7	$1,9 \times 10^8$
ST 8	$2,1 \times 10^8$
ST 9	$1,9 \times 10^8$
ST 10	$1,8 \times 10^8$
ST 11	$1,1 \times 10^8$
ST 12	$1,9 \times 10^8$

Los primeros síntomas (ya sea cancro en tallo o marchitamiento de las hojas) comenzaron a observarse en promedio alrededor de 11 dpi para algunas cepas, y para otras recién a los 21 dpi. La Figura 4-1 presenta fotos de los síntomas típicos encontrados a lo largo de este ensayo.

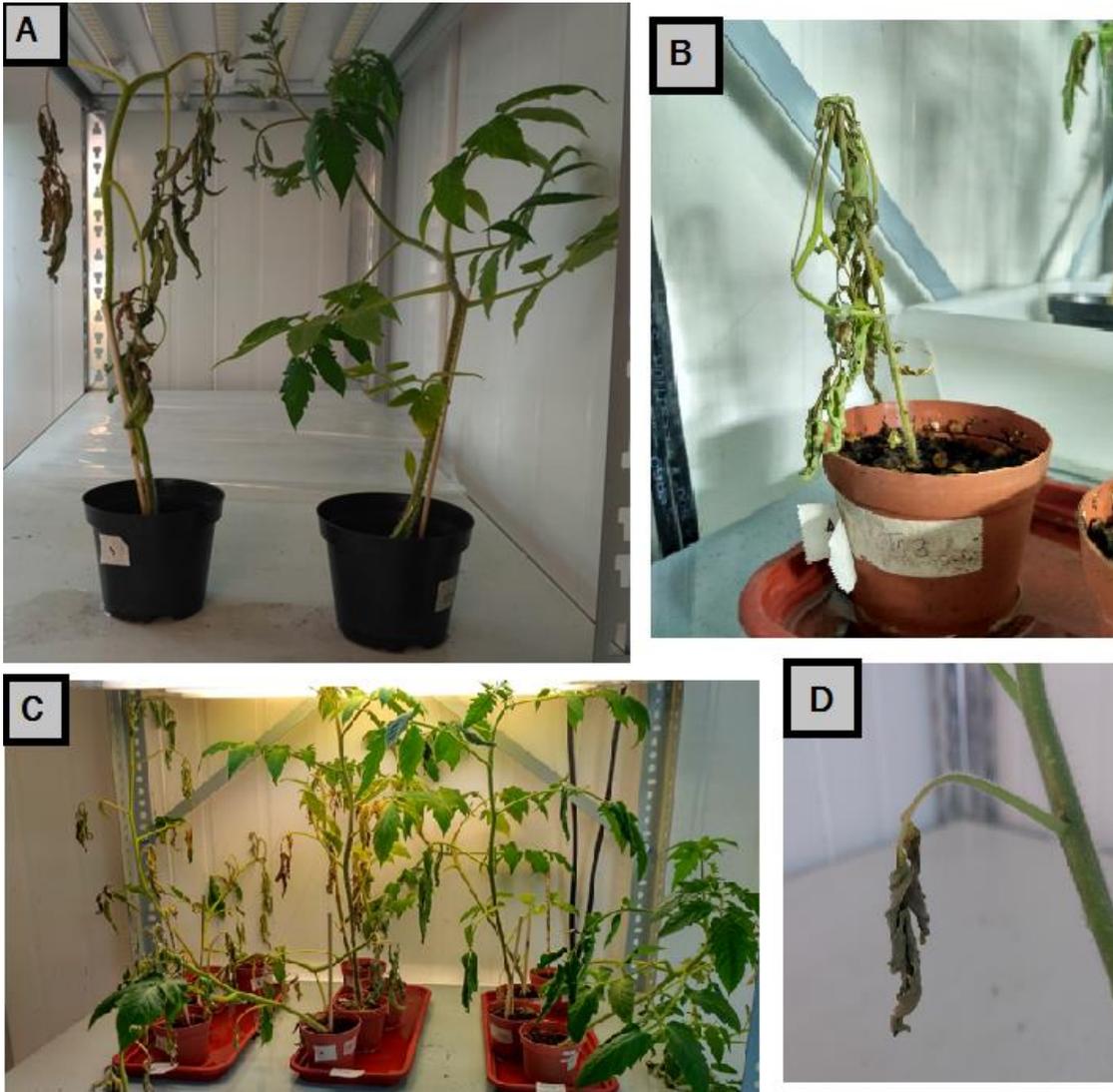


Figura 4-1. Fotos del ensayo de agresividad de las 12 cepas de Cmm. A, Planta infectada por Cmm (a la izquierda) y planta inoculada con agua estéril (a la derecha); B, Planta muerta por deshidratación causada por la infección de Cmm; C, plantas de tomate inoculadas con 3 cepas de Cmm con diferencias en la agresividad; D, aparición del primer síntoma en una plántula de tomate.

En la Figura 4-2 se muestran los resultados de la aparición del primer síntoma de la enfermedad causada por Cmm. Se calculó el día promedio de la aparición del primer síntoma para cada cepa y su error estándar asociado. Como se puede ver, la cepa ST 12 fue la primera en presentar síntomas, y la cepa ST 2 la última en presentarlos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las cepas debido a la alta variabilidad de la aparición del primer síntoma entre cada réplica biológica.

La cepa ST 3 no presentó síntomas a lo largo de todo el ensayo, a pesar de que se verificó mediante recuento en microgota que luego de 29 dpi la bacteria se encontraba dentro de las 4 plantas inoculadas en una concentración promedio de $3,7 \times 10^{10}$ ufc/g. A modo de comparación, también se realizó recuento de las

plantas inoculadas con la cepa ST 6 (una de las cepas que presentaba una mayor cuantificación *in planta* a los 3 dpi, ver ítem 4.4), encontrando una concentración promedio del patógeno de $4,7 \times 10^{11}$ ufc/g.

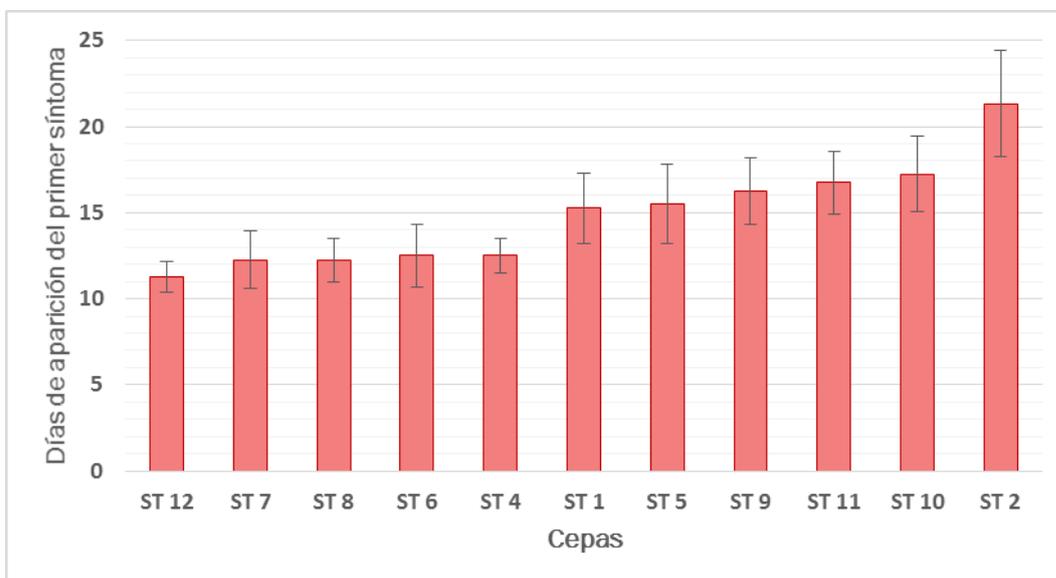


Figura 4-2. Gráfico donde se representa el día promedio de la aparición del primer síntoma para cada cepa de Cmm. Las barras negras representan el error estándar asociado. No se observaron diferencias significativas entre los STs, $p > 0.05$.

Para la expresión de los resultados del ensayo de agresividad se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) (ver ítem 3.3). A modo de ejemplo, en la Figura 4-3 se muestra una curva de progresión de la enfermedad de la cepa ST 6, la cual se realizó calculando el promedio de hojas enfermas/total de hojas para cada planta a lo largo del tiempo. La realización de dicha curva se repitió para todas las cepas.

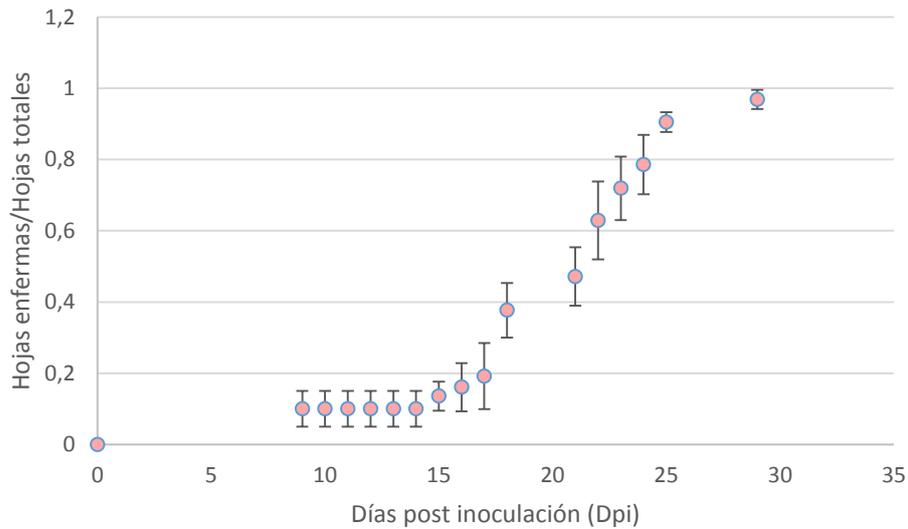


Figura 4-3. Curva de progresión de la enfermedad de la cepa ST 6, donde los puntos corresponden al promedio de la cantidad relativa de hojas enfermas y las barras negras a su error estándar asociado.

En la Figura 4-4 se muestran los resultados del ABCPE calculada para todas las cepas, donde se observa un gradiente con diferencias significativas de agresividad distinguiendo entre 3 grupos de cepas: en primer lugar se encuentra la cepa ST 12, luego un grupo de agresividad intermedia conformado por las cepas ST 6, 4, 1, 8, 7, 5 y 10 y finalmente un grupo de baja agresividad correspondiente a las cepas ST 11, 9 y 2.

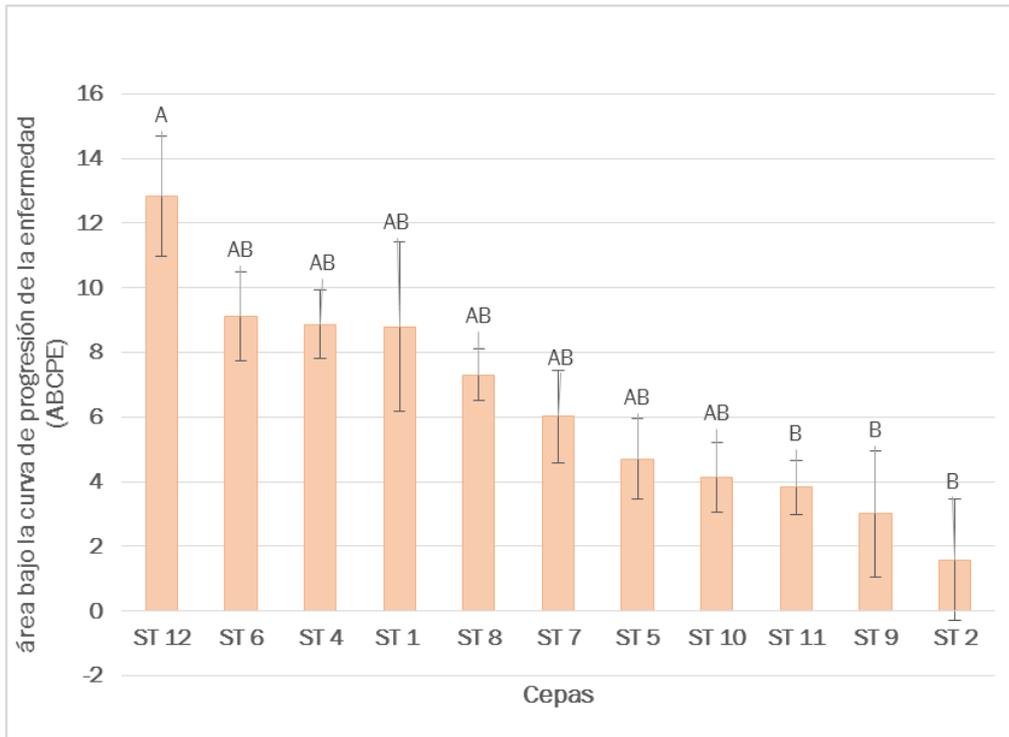


Figura 4-4. Resultados del ensayo de agresividad de las 12 cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* donde cada barra naranja representa el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) y las barras negras su error estándar asociado. Las letras sobre las barras representan los diferentes grupos de agresividad, cepas con letras diferentes presentan diferencias significativas de agresividad en base al índice de Tukey ($p < 0.05$)

4.2 Optimización de un método para la cuantificación de Cmm *in planta* mediante qPCR

4.2.1 Evaluación de los sistemas *Ptssk* y *MVS21*

Para seleccionar el mejor sistema de *primers* y sonda para la cuantificación absoluta de Cmm mediante TaqMan qPCR se realizó una curva de calibración con estándares de ADN genómico de Cmm en un rango de concentraciones de $1,9 \times 10^6$ eg/ μ L hasta 1,9 eg/ μ L de ADN. Con esta curva de calibración se realizó una reacción de qPCR con ambos sistemas. La Figura 4-5 muestra el resultado del gráfico de fluorescencia vs. ciclos obtenido con el juego de *primers Ptssk*.

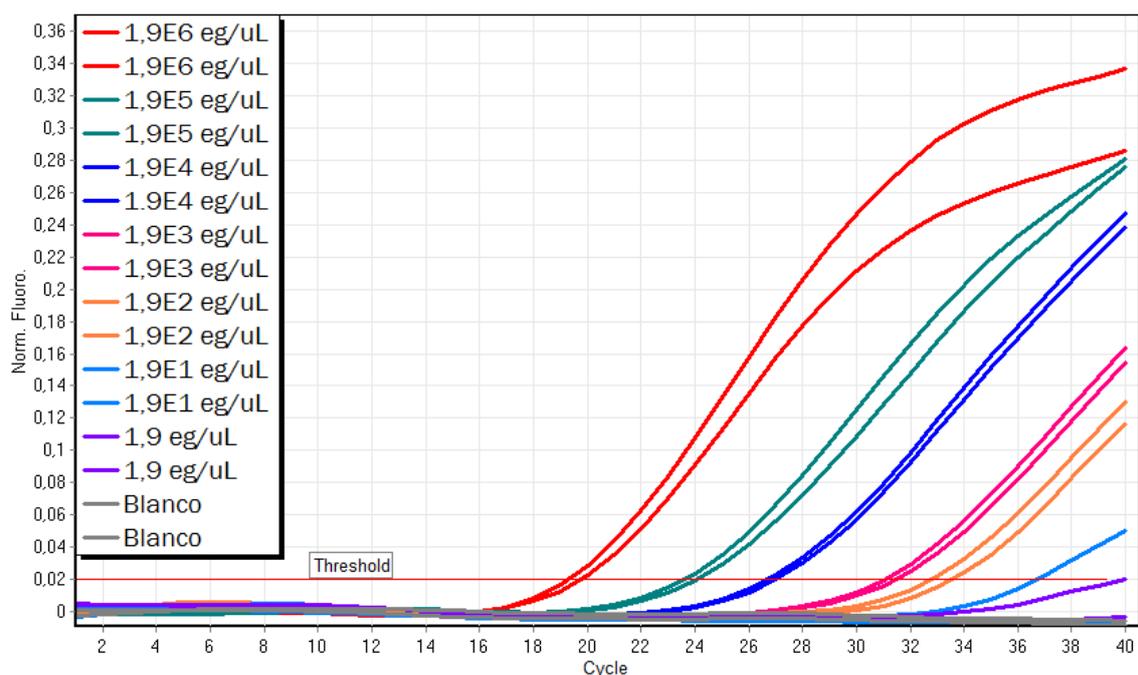


Figura 4-5. Gráfico de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación de diluciones seriadas al décimo de ADN genómico de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* con el sistema de *primers* y sonda *Ptssk*. En la leyenda se muestra el color correspondiente a la cantidad de ADN en cada reacción. El umbral fue fijado en 0,02.

A partir de los valores C_q obtenidos y conociendo las concentraciones de cada dilución de ADN de Cmm se construyó la curva de calibración que se muestra en la Figura 4-6. Para la construcción de dicha curva, no se tuvieron en cuenta los puntos de concentraciones más bajas ya que no fueron detectados por qPCR (se tomó como negativos todos los valores de C_q mayores a 35).

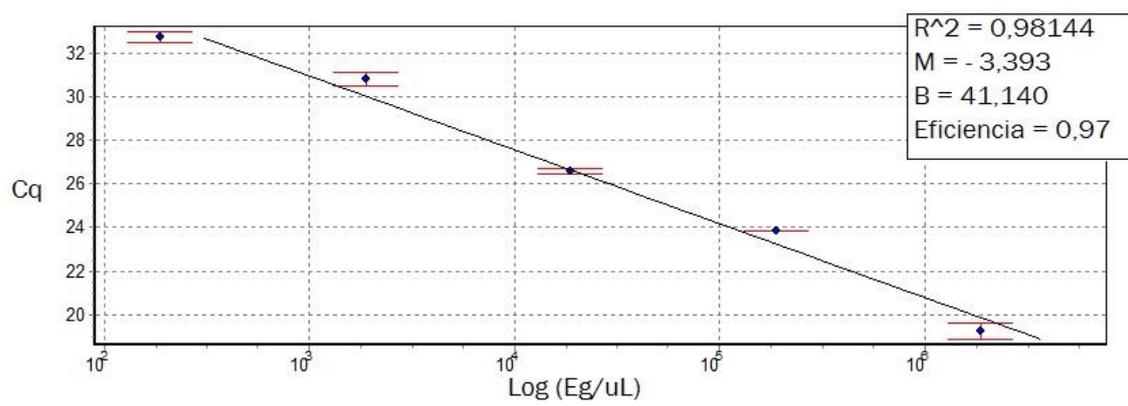


Figura 4-6. Curva de calibración de la reacción de qPCR para la cuantificación absoluta de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* con el sistema de *primers Ptssk*. Cada punto está representado por el valor de C_q promedio para cada estándar de ADN genómico analizado y su desviación estándar (barras rojas). En el margen superior derecho se indican los parámetros de la curva.

La curva de calibración obtenida para el juego de *primers Ptssk* tuvo una eficiencia de amplificación del 97%, siendo el rango lineal de cuantificación de $1,9 \times 10^6$ eg/ μ L a $1,9 \times 10^2$ eg/ μ L. El coeficiente de regresión lineal (R^2) fue de 0,98144, lo que demuestra un buen ajuste lineal de los datos. La ecuación obtenida para el sistema de *primers Ptssk* fue:

$$Y = -3,393x + 41,140$$

Siendo “Y” el valor de Cq y “x” el logaritmo en base 10 de la concentración de ADN de Cmm de la muestra expresada en eg/ μ L.

Los resultados para el sistema de *primers* y sonda *MVS21* se muestran en las figuras 4-7 y 4-8.

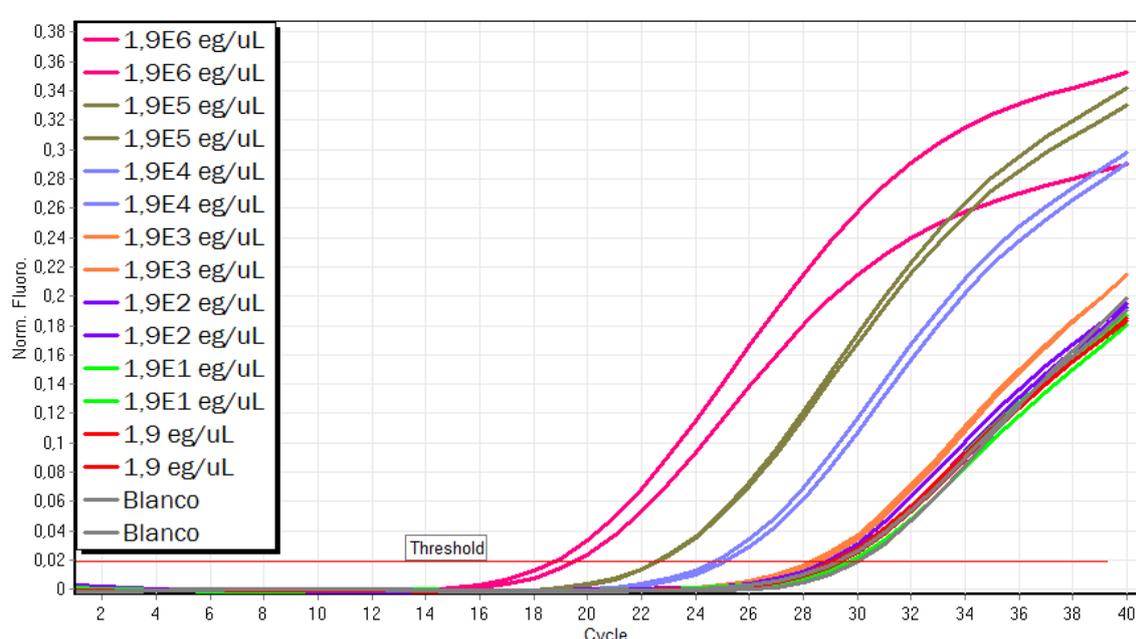


Figura 4-7. Gráfico de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación de diluciones seriadas al décimo de ADN genómico de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* con el sistema de primers y sonda *MVS21*. En la leyenda se muestra el color correspondiente a la cantidad de ADN en cada reacción. El umbral fue fijado en 0,02.

En este caso, se tuvieron que descartar los últimos cuatro puntos (de $1,9 \times 10^3$ eg/ μ L a 1,9 eg/ μ L) debido a que daban la misma señal que los blancos. Esta curva se repitió con nuevas diluciones de ADN, de *primers* y sonda y nuevos reactivos. Sin embargo, se siguió detectando amplificación en los blancos que se supuso que se debió a contaminación de los stocks de *primers* o de sonda.

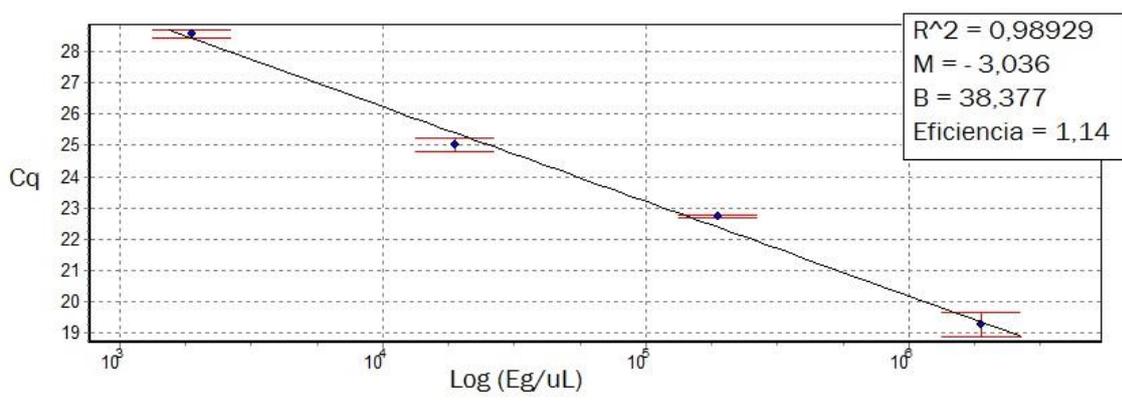


Figura 4-8. Curva de calibración de la reacción de qPCR para la cuantificación absoluta de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* con el sistema de primers *MVS21*. Cada punto está representando el valor de Cq promedio para cada estándar de ADN genómico analizado y su desviación estándar (barras rojas). En el margen superior derecho se indican los parámetros de la curva.

Con lo cual, la curva de calibración obtenida (Figura 4-8) tuvo una eficiencia de amplificación de 114% y un rango lineal de cuantificación de $1,9 \times 10^6$ eg/ μ L a $1,9 \times 10^4$ eg/ μ L. Su coeficiente de regresión lineal fue de 0,98929, lo que demuestra un muy buen ajuste lineal. La ecuación obtenida para este sistema de primers fue:

$$Y = -3,036x + 38,377$$

Siendo “Y” el valor de Cq y “x” el logaritmo en base 10 de la concentración de ADN de Cmm de la muestra expresada en eg/ μ L.

Todos los datos crudos obtenidos en estos análisis se encuentran disponibles en el Apéndice.

En resumen, el juego de primers *Ptssk* tiene mayor sensibilidad para la detección de ADN de Cmm (detecta hasta $1,9 \times 10^2$ eg/ μ L), y una mejor eficiencia de amplificación en comparación con el juego de primers *MVS21*. A su vez, para el sistema *MVS21* se observó amplificación en los blancos de reacción debido a contaminación en algún reactivo, lo que interfiere en la cuantificación especialmente cuando el patógeno se encuentra en bajas concentraciones. En base a estos resultados, se continuó trabajando con el sistema *Ptssk*.

4.2.2 Elección del método de extracción de ADN de Cmm a partir de plantas infectadas

Para la evaluación de los métodos, se inocularon plántulas de tomate con una suspensión de Cmm previamente ajustada a 1×10^8 ufc/mL y se extrajo el ADN de dichas plántulas a los 2 días post inoculación como se indica en ítem 3.5.4 de Materiales y Métodos. Se realizó la extracción de ADN de Cmm a partir del tejido vegetal infectado y se cuantificó el patógeno por qPCR utilizando el sistema *Ptssk*.

En la tabla 4-2 se muestran los Cq obtenidos para cada método evaluado. Para la elección del método de extracción de ADN se tuvo en cuenta el valor de Cq obtenido, la sensibilidad del método, su reproducibilidad, y su facilidad.

Tabla 4-2 Cq promedio obtenidos para cada método de extracción de ADN de plantas junto con su error estándar asociado.

Método	Cq promedio	Error estándar
TRIsure (Bioline)	30,63	0,32
PureLink™ Plant (Invitrogen)	27,54	0,14
Charge Switch (Invitrogen)	27,61	0,53

Los resultados obtenidos a partir de la evaluación de los tres métodos de extracción de ADN (Charge Switch, TRIsure, PureLink™ Plant), nos permitieron seleccionar el método PureLink™ Plant, ya que es el método para el cual se obtuvo menor Cq partiendo de un inóculo de 1×10^8 ufc/mL, y un menor error estándar asociado.

4.2.3 Evaluación del efecto matriz

Para la evaluación del efecto matriz, se construyó una nueva curva de calibración con diluciones seriadas al décimo de ADN genómico de Cmm, utilizando matriz como diluyente en lugar de agua (ver ítem 3.5.5). Se utilizó como matriz ADN extraído a partir de plantas de tomate no infectadas utilizando el kit PureLink™ Plant. Se realizó una reacción de qPCR con esta curva de calibración utilizando el sistema de *primers* y sonda *Ptssk* y se compararon los parámetros obtenidos en relación a la curva de calibración en agua. En la Figura 4-9 se observan los resultados obtenidos. De esta forma, se busca determinar si los componentes coextraídos por este método tienen algún efecto de inhibición de la amplificación que pueda afectar la cuantificación de Cmm in planta por qPCR.

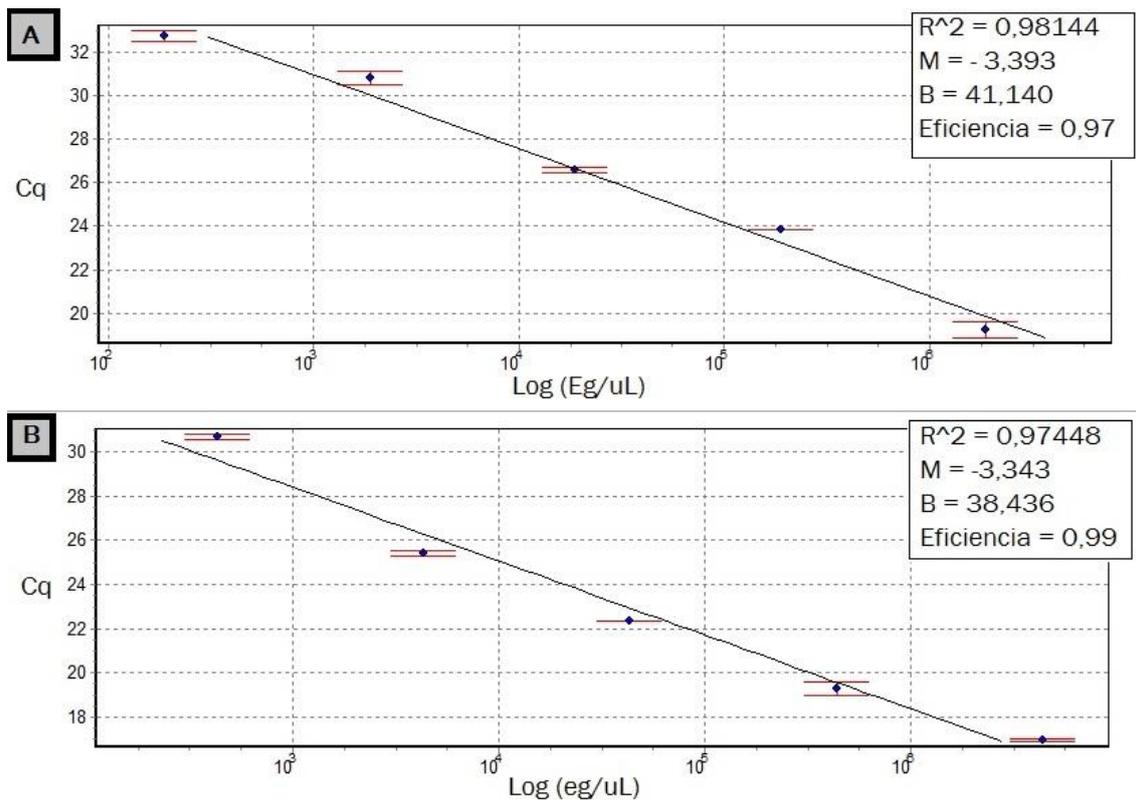


Figura 4-9. Curvas de calibración de las reacciones de qPCR construidas a partir de las diluciones seriadas de ADN de Cmm en agua (A) y en matriz (B) con el sistema de *primers Ptssk*. Cada punto azul representa el valor de Cq promedio y las barras rojas representan el error estándar. En el margen superior derecho se indican los parámetros de la curva.

La ecuación obtenida para la curva de calibración realizada en matriz de planta fue la siguiente

$$Y = -3,343x + 38,436$$

Siendo “Y” el valor de Cq y “x” el logaritmo en base 10 de la concentración de ADN de Cmm de la muestra expresada en eg/ μ L.

Esta curva de calibración es la que se utilizará posteriormente para la cuantificación *in planta*. Todos los datos crudos obtenidos en estos análisis se encuentran disponibles en el Apéndice.

Se obtuvo una eficiencia de amplificación muy similar (97% y 99%) y ambas curvas tienen una muy buena sensibilidad, permitiendo detectar hasta 1×10^2 eg/ μ L de ADN. Las dos curvas tienen un buen ajuste lineal. Con lo cual, en el caso de tener un ADN con una concentración comprendida en el rango de cuantificación, se obtendría un Cq muy similar en matriz o en agua. En base a estos resultados se concluye que en las condiciones de trabajo utilizadas no existe un efecto de inhibición de la amplificación asociado a la matriz.

4.3 Seguimiento del proceso de infección de una cepa de Cmm en plantas de tomate inoculadas

El seguimiento del proceso de infección se realizó con el fin de determinar un tiempo post inoculación óptimo para el análisis comparativo de la multiplicación *in planta* de los 12 STs. Para ello, se inocularon plántulas de tomate con una suspensión de Cmm (ST 6) previamente ajustada (ver ítem 3.6). La absorbancia de dicho inóculo fue de 0,174 y mediante recuento en microgota se confirmó que su concentración corresponde a $1,7 \times 10^8$ ufc/mL. Para determinar la concentración de Cmm *in planta* se compararon dos metodologías: qPCR y recuento en placa mediante la técnica de microgota.

En la Figura 4-10 se muestran los resultados obtenidos mediante qPCR. En la figura 4-11 se muestra un ejemplo de resultado de los recuentos en microgota.

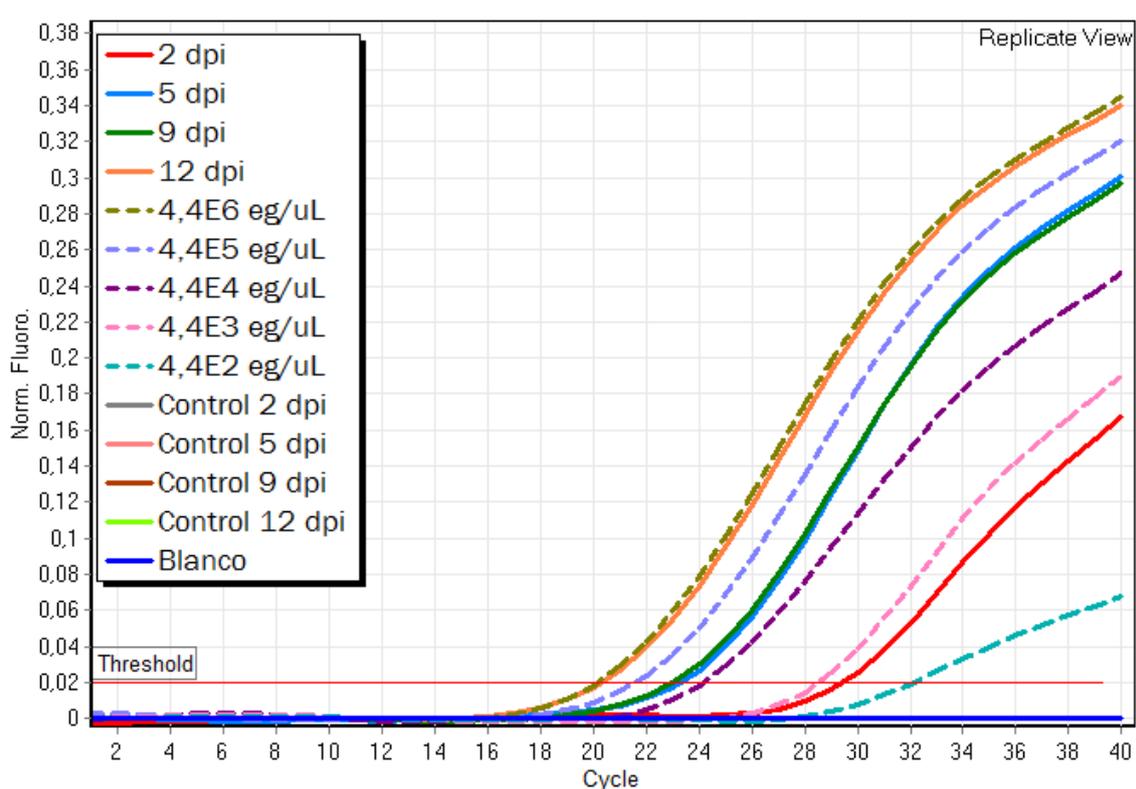


Figura 4-10. Gráfico de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación de extracciones de ADN de plantas inoculadas a diferentes tiempos junto con la curva de calibración en matriz para la cuantificación absoluta de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis in planta*. En la leyenda se muestra en línea entera el color correspondiente a cada tiempo y con línea punteada los estándares de ADN de la curva de calibración. El umbral fue fijado en 0,02. Se muestran las curvas promedio (*Replicate view*) de las tres réplicas biológicas para cada muestra.

Los resultados obtenidos mediante qPCR tuvieron una reproducibilidad entre réplicas biológicas muy buena. En este caso, el cambio más abrupto en la concentración de Cmm *in planta* se observó entre los 2 dpi y los 5 dpi. En los tiempos posteriores (5, 9 y 12 dpi) la concentración de Cmm *in planta* aumenta más levemente, y tiende a volverse constante (Figura 4-10, Figura 4-12). Todos los datos crudos obtenidos en estos análisis se encuentran disponibles en el Apéndice.

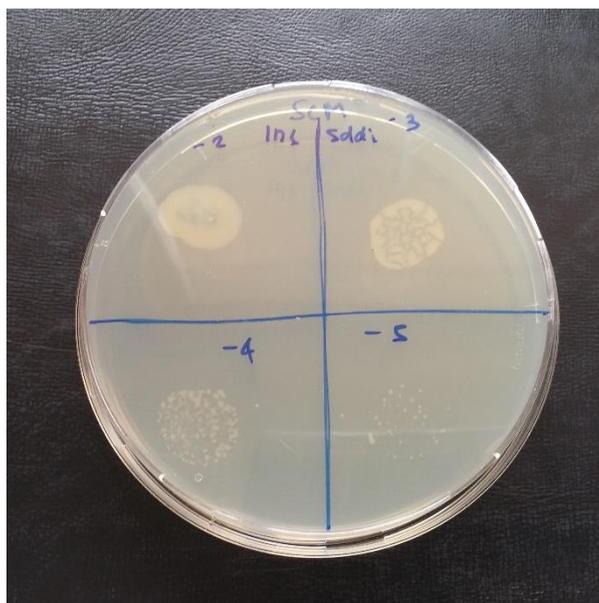


Figura 4-11. Resultado de recuento en microgota en placa de medio selectivo SCM de la cepa ST 6 a los 5 días post inoculación en planta de tomate. En el cuadrante izquierdo arriba se sembró la dilución (-2), derecho arriba la dilución (-3), izquierdo abajo (-4) y derecho abajo (-5). La única dilución con colonias contables es la (-5).

Todos los resultados obtenidos por recuento en microgota fueron expresados en unidades formadoras de colonias/mL (ufc/mL). Al igual que el resultado obtenido mediante qPCR, el cambio más abrupto de la concentración de Cmm *in planta* mediante este método se observa entre 2 dpi y 5 dpi. Sin embargo, este cambio no es tan notorio, si no, que se observa un aumento más gradual a lo largo de la infección (Figura 4-12).

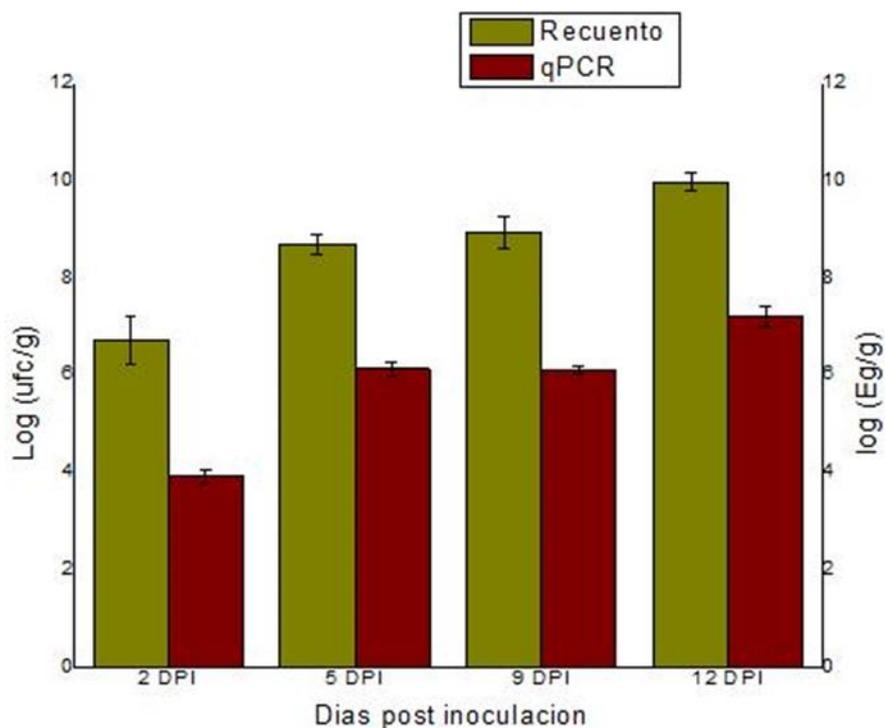


Figura 4-12. Gráfico de los resultados del seguimiento de una cepa de Cmm obtenido por qPCR (violeta) y recuento en microgota (verde). En ambos casos, las barras negras corresponden al error estándar asociado.

La Figura 4-12 compara los resultados obtenidos con los métodos evaluados. En base a estos resultados, se seleccionó el tiempo 3 dpi para el análisis comparativo de la multiplicación *in planta* de las 12 cepas de Cmm.

4.4 Análisis comparativo de la multiplicación *in planta* de los 12 STs de Cmm

Para realizar la comparación de la capacidad de multiplicación *in planta* de las 12 cepas de Cmm se inocularon plántulas de tomate con una suspensión de cada ST de Cmm previamente ajustada (ver ítem 3.7). Se utilizó el mismo inóculo que en el ítem 4.1 (ver Tabla 4-1). A los 3 dpi se extrajo el ADN de cada una de las plántulas inoculadas y los controles de agua. Para determinar la concentración de Cmm *in planta* se compararon dos metodologías: qPCR y recuento en placa mediante la técnica de microgota. En la tabla 4-3 se muestran los resultados del recuento en microgota junto con los de qPCR. Todos los datos crudos obtenidos en estos análisis se encuentran disponibles en el Apéndice.

Tabla 4-3. Resultados de la cuantificación de los 12 STs de *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* en plantas de tomate infectadas luego de 3 días posteriores a la inoculación. Se muestran los resultados de cuantificación mediante recuento en microgota y qPCR.

Cepa	Concentración del inóculo inicial (ufc/ml)	Log (ufc/g) (recuento en microgota)	Log (Eg/g) (qPCR)
ST 1	$7,0 \times 10^7$	$7,2 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,2$
ST 2	$1,4 \times 10^9$	$6,7 \pm 0,8$	$3,5 \pm 0,2$
ST 3	$1,7 \times 10^8$	$7,2 \pm 0,8$	$3,8 \pm 0,1$
ST 4	$1,2 \times 10^8$	$7,7 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,1$
ST 5	$1,3 \times 10^8$	$7,5 \pm 0,7$	$3,7 \pm 0,2$
ST 6	$1,3 \times 10^8$	$8,5 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,1$
ST 7	$1,9 \times 10^8$	$6,9 \pm 0,9$	$4,2 \pm 0,1$
ST 8	$2,1 \times 10^8$	$7,1 \pm 0,7$	$5,4 \pm 0,2$
ST 9	$1,9 \times 10^8$	$7,9 \pm 0,8$	$5,4 \pm 0,1$
ST 10	$1,8 \times 10^8$	$7,2 \pm 0,6$	$3,9 \pm 0,1$
ST 11	$1,1 \times 10^8$	$6,9 \pm 0,5$	$4,6 \pm 0,2$
ST 12	$1,9 \times 10^8$	$>8,8 \pm 0,5$	$5,0 \pm 0,1$

El valor de recuento para la ST 12 se consideró mayor a 8,76, debido a que 3 de las 4 réplicas biológicas dieron un recuento mayor a 50 colonias en el cuadrante de la placa (valor que se consideró como límite de detección). Los valores de recuento por microgota dieron una alta variabilidad entre las réplicas biológicas que se asocia con errores experimentales. Este ensayo debería repetirse. Por esta razón sólo se continúan analizando los resultados obtenidos por qPCR.

En la Figura 4-13 y 4-14 se muestran los resultados obtenidos por qPCR. Estos resultados muestran que se encontraron diferencias significativas entre las 12 cepas, observándose un gradiente de la capacidad de multiplicación del patógeno *in planta* luego de 3 días de la inoculación.

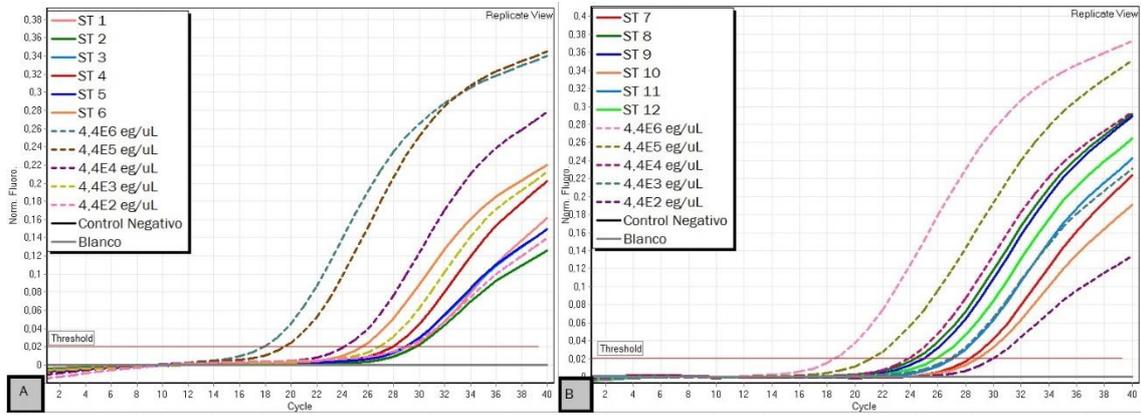


Figura 4-13 Gráfico de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación de extracciones de ADN de plantas inoculadas con los ST1 a ST6 (A), y con los ST 7 a ST 12 (B) de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* junto con la curva de calibración en matriz para la cuantificación absoluta *in planta*. En la leyenda se muestra en línea entera el color correspondiente a cada ST y con línea punteada la cantidad de ADN en cada estándar. El umbral fue fijado en 0,02.

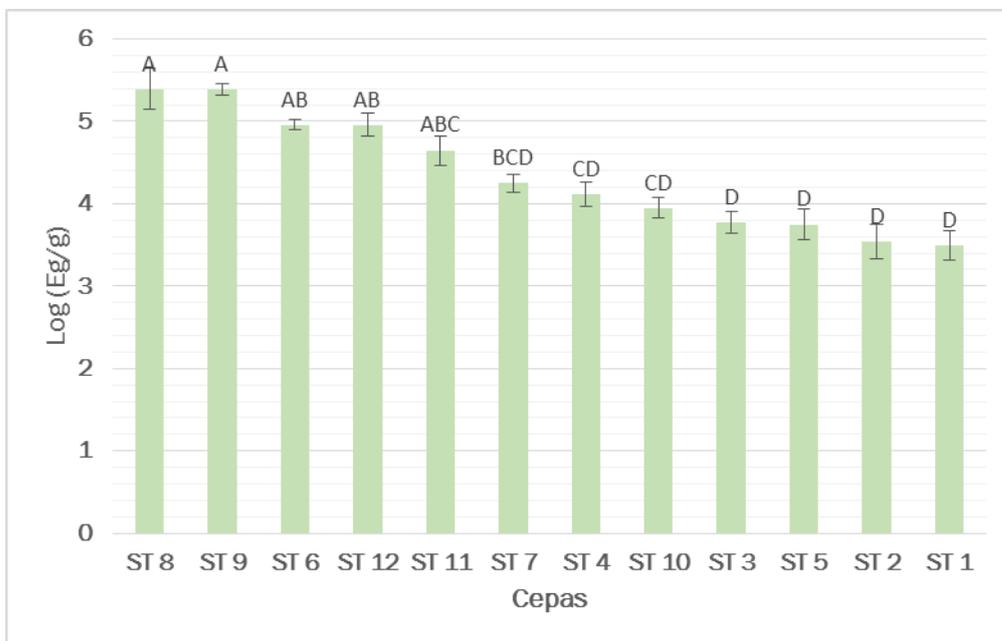


Figura 4-14. Resultados del análisis comparativo de la multiplicación in planta de las 12 cepas, donde las barras verdes corresponden a los equivalentes genómicos de Cmm por gramo de tejido vegetal, determinados mediante cuantificación por qPCR. Las barras negras representan el error estándar asociado a cada ST. Las letras sobre las barras representan los niveles de multiplicación, cepas con letras diferentes presentan diferencias significativas en base al índice de Tukey ($p < 0.05$)

4.5 Evaluación de la producción de biofilm

Para el estudio de la capacidad de producción de biofilm de las 12 cepas de Cmm se probaron diversos medios de cultivos. Entre ellos el medio nutriente, NBY, así como los medios mínimos M9 y XMM.

En primera instancia, se realizó una curva de crecimiento de Cmm en los medios NBY y XMM para determinar los tiempos de incubación a 28 °C para la realización del ensayo. La incubación de Cmm en XMM alcanzó una DO de 0,5 a los 7 días, mientras que con NBY la alcanzó a los 2 días. Sin embargo, no se logró verificar la formación de biofilm con ninguno de estos medios con ninguna de las 12 ST de Cmm en las condiciones ensayadas.

En el caso del medio M9, se realizaron dos ensayos: uno con M9 y otro con M9 suplementado con 1% de glucosa. A su vez, se probaron dos diluciones: 1:10 y 1:100 de un cultivo crecido durante 72 horas a 28 °C. En ambos casos se pudo verificar la producción de biofilm para algunas de las cepas, pero se observó mayor producción de biofilm partiendo de la dilución 1:10. A su vez, se observó mayor producción de biofilm utilizando el medio M9 suplementado con 1% de glucosa. Este ensayo permitió definir que para el análisis comparativo de las 12 cepas se utilizará la dilución 1:10 y el medio M9 suplementado con 1% de glucosa.

Se realizó la evaluación de formación de biofilm cualitativa. En la figura 4-15 se muestra a modo de ejemplo el resultado obtenido con algunas de las cepas.

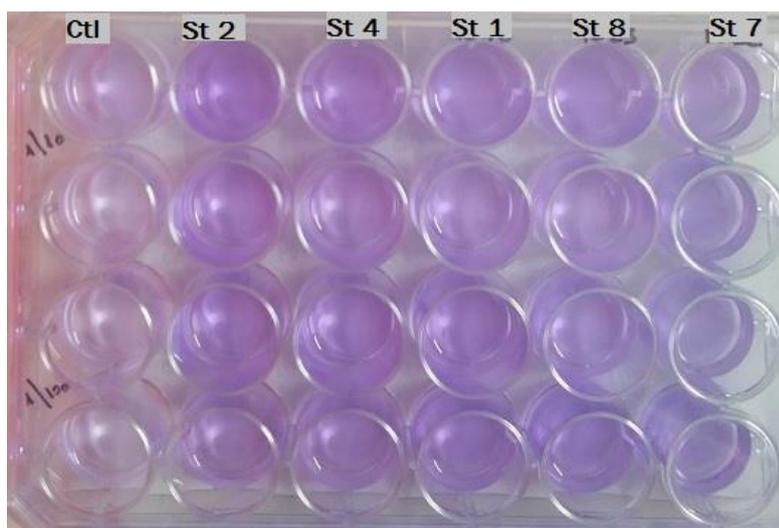


Figura 4-15. Placa de 24 pocillos luego del revelado con cristal violeta para la verificación de la formación de biofilm. Esta placa fue incubada con distintas cepas de Cmm crecidas en el medio mínimo M9 durante 7 días. Las columnas indican la cepa correspondiente. En las dos primeras filas se partió de una dilución 1:10 del inóculo inicial de Cmm, y en las dos últimas, de una dilución 1:100.

Por otra parte, se hizo un análisis cuantitativo de la producción de biofilm. Los resultados se expresan como absorbancia relativa (absorbancia post revelado / absorbancia pre revelado). En la Figura 4-16 se muestran los resultados obtenidos para el ensayo realizado a partir de la dilución 1:10, la condición para la cual se observó mayor producción de biofilm. Se muestra como resultado, la absorbancia relativa obtenida a partir del promedio entre la absorbancia de las réplicas de cada una de las cepas.

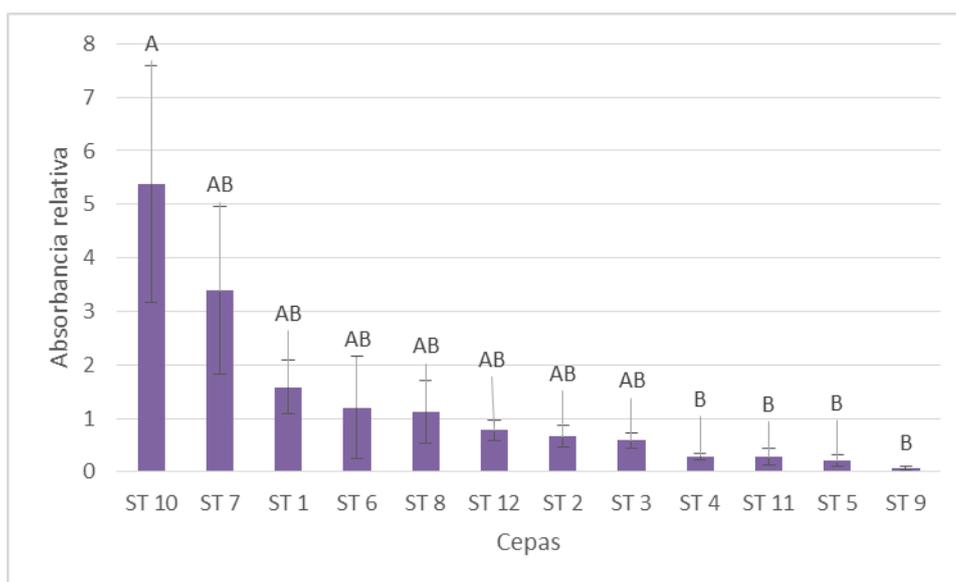


Figura 4-16. Resultados de producción de biofilm para los 12 STs de Cmm partiendo de una dilución 1:10 del cultivo inicial incubado durante 72 horas. En violeta se observa la producción de biofilm en el medio M9 y en celeste se observa la producción de biofilm en el medio M9 suplementado con 1% de glucosa.

La producción de biofilm presentó diferencias significativas entre las 12 cepas de Cmm. La cepa correspondiente al ST 10 es la que presenta un mayor nivel de producción, distinguiéndose significativamente respecto a las cepas correspondientes a los STs 4, 5, 9 y 11. El resto de las cepas evaluadas presentaron un nivel intermedio de producción de biofilm.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo se buscaron diferencias fenotípicas relacionadas con la virulencia entre cepas de Cmm pertenecientes a diferentes variantes alélicas. En primer lugar, se evaluaron dos características del patógeno para determinar su potencial patogénico: su capacidad de multiplicación *in planta* en etapas tempranas y su agresividad. Para evaluar la agresividad de las distintas cepas, se evaluaron simultáneamente 2 variables dependientes: la aparición del primer síntoma (marchitamiento unilateral de la primer hoja verdadera o aparición de canchales en el tallo) y el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (porcentaje de hojas enfermas vs hojas sanas a lo largo del tiempo). La aparición del primer síntoma no se pudo tomar como un parámetro para determinar diferencias entre cepas ya que no evidenció diferencias significativas entre las mismas (Figura 4-2). Esto se debió a la gran variabilidad entre las réplicas biológicas, ya que dos plantas diferentes pueden responder de maneras distintas al mismo patógeno, resultando más resistentes o más sensibles, además de tener una gran variabilidad experimental ya que es una medida visual. En el caso del área bajo la curva de progreso de la enfermedad (Figura 4-3; Figura 4-4), se trata de una variable más globalizadora que se utiliza tradicionalmente en estudios comparativos de la agresividad de diferentes patógenos. En este estudio, esta variable presentó un mayor poder de discriminación permitiendo detectar 3 grupos de cepas con diferencias significativas de agresividad. Sin embargo, a partir del análisis realizado se observa mayormente un gradiente en la agresividad de las cepas, pudiendo distinguir estadísticamente únicamente los grupos de mayor y menor agresividad.

Si comparamos los resultados obtenidos, puede observarse que existe alguna correlación entre ambas variables. Se destaca la cepa ST 12, que presentó una mayor agresividad tanto en función del tiempo de aparición del primer síntoma como en relación a la progresión de la severidad de los síntomas a lo largo del tiempo (ABPCE). Por otro lado, las cepas ST 2, ST 9 y ST 11 son las que mostraron una menor agresividad en ambos casos. Otro resultado interesante es lo observado para la cepa ST 3. Esta cepa no fue capaz de producir síntomas en ninguna de las plantas inoculadas, a pesar de que a los 3 dpi se encontraba multiplicándose *in planta* (Figura 4-14) y que la presencia de células viables en las cuatro réplicas biológicas se verificó mediante recuento en microgota a los 29 dpi, una vez culminado el ensayo. Resultados similares fueron encontrados en otro trabajo donde se identificaron cepas muy agresivas que llevaban a un desarrollo de la enfermedad rápida y la devastación completa de la planta, y cepas que no inducían

síntomas a pesar de la presencia de uno o más factores de virulencia (Zaluga *et al.*, 2013). Por lo cual, la cepa ST 3 en particular podría carecer de ciertos factores de patogenicidad como ser los presentes en los plásmidos pCM1 y pCM2 decisivos en la inducción de síntomas, pero que no afectan la capacidad de multiplicación *in planta*. Para verificar dicha hipótesis, se debería extraer el ADN de la cepa ST 3 reaislada de las plantas inoculadas, y realizar una PCR utilizando *primers* específicos para los factores de patogenicidad identificados. Se debe tener en cuenta también que la presencia de los principales factores de patogenicidad en los 12 STs de Cmm y su capacidad de presentar síntomas *in planta* fue verificada mediante PCR en trabajos anteriores (Croce, 2016). Sin embargo, la variedad de la planta de tomate utilizada en el trabajo de Croce (2016) no es la misma variedad que las que se utilizaron en este trabajo. Esto podría explicar las diferencias en agresividad de la cepa ST 3. A su vez, otra hipótesis es que la planta podría poseer un mecanismo de defensa contra la cepa ST 3 en particular. También es posible que existan otros determinantes genéticos relevantes para la patogenicidad de Cmm que aún no han sido identificados y que sería interesante evaluar en esta cepa avirulenta. Esto podría lograrse, por ejemplo, a través de estudios más profundos a nivel genómico.

Por otra parte, para evaluar la capacidad de multiplicación de Cmm *in planta* se utilizó la técnica de PCR a tiempo real (qPCR). Esta técnica nos permitió cuantificar las células bacterianas del patógeno presentes en la planta a diferentes tiempos luego de la inoculación y en un rango amplio de concentraciones. Debido a sus indudables ventajas, como la rapidez, sensibilidad, eficiencia y menor riesgo de contaminación cruzada, esta técnica está siendo utilizada para la cuantificación de diversos patógenos tanto bacterianos como virales (Ricchi *et al.*, 2017). El uso de sondas de hidrólisis (Taqman) brinda aún mayor especificidad evitando la amplificación inespecífica que puede ocurrir utilizando agentes intercalantes como *Sybr Green*. En este trabajo, se evaluaron dos sistemas de cebadores y sonda para qPCR reportados en bibliografía (Berendsen *et al.*, 2011; ISF, 2015) y se seleccionó el sistema *Ptssk*, el cual presentó mayor sensibilidad para la detección del patógeno, con un límite de $1,9 \times 10^2$ eg/ μ L. Se obtuvo el mismo límite de sensibilidad en la detección de Cmm en plantas, lo que sugiere que no existe inhibición por parte de la matriz en este tipo de muestras en las condiciones de trabajo utilizadas.

Para comparar la capacidad de colonización de las 12 cepas de Cmm, se determinó en primera instancia, un tiempo post inoculación para la extracción de ADN de las plántulas inoculadas. Esto se llevó a cabo mediante el seguimiento del proceso de infección en plantas inoculadas con una cepa de Cmm. Este

seguimiento se realizó mediante la cuantificación de Cmm *in planta* utilizando la técnica de qPCR y por recuento en microgota. Los resultados obtenidos (Figura 4-12) mostraron (con ambas metodologías) un aumento en la población del patógeno a lo largo del tiempo, lo que explica la colonización del patógeno dentro de la planta. Esta población tiende a volverse constante en la medida que comienzan a aparecer síntomas. La metodología utilizada en este trabajo (extracción de ADN y luego qPCR) permite cuantificar tanto células bacterianas viables como no viables, siendo imposible la diferenciación entre las mismas, mientras que el recuento en microgota cuantifica todas las células vivas que tengan la capacidad de crecer en la placa. Por lo cual, podría esperarse que los resultados de cuantificación obtenidos mediante qPCR fueran mayores que los obtenidos por recuento en microgota. Sin embargo, los recuentos dieron niveles considerablemente mayores que la cuantificación por qPCR. Esto se puede deber a un bajo rendimiento de extracción de ADN del patógeno con el kit de extracción seleccionado. En este trabajo, no era de vital importancia que el resultado de la cuantificación absoluta fuera exacto, ya que lo que se busca es realizar un estudio comparativo entre las 12 cepas de Cmm. Por ende, la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) puede ser utilizada.

Los resultados del seguimiento del proceso de infección de una cepa en plantas de tomate inoculadas permitieron concluir que 3 dpi era un tiempo óptimo para la realización del análisis comparativo de las 12 cepas ya que el cambio más abrupto de crecimiento se observó entre los 2 y 5 dpi. Se seleccionó un tiempo intermedio entre estos dos, ya que 5 dpi se consideró que era un tiempo algo extenso y los resultados obtenidos para 2 dpi se encontraban muy cerca del primer punto de la curva de calibración realizada.

Para el análisis comparativo de las 12 cepas de Cmm se utilizaron dos metodologías: qPCR y recuento en microgota. Los resultados obtenidos mediante recuento en microgota tuvieron una alta variabilidad entre las réplicas biológicas debido a errores experimentales. Cabe destacar que esta metodología es mucho más laboriosa y requiere tiempos de análisis mucho más largos y experiencia en el reconocimiento de las colonias típicas de Cmm. Los resultados obtenidos mediante qPCR permitieron observar un gradiente de la capacidad de multiplicación *in planta* entre las cepas (Figura 4-14). Esto permite llegar a la conclusión de que existe la posibilidad de que la capacidad de colonización esté determinada por múltiples factores. Para la mayoría de las cepas el recuento del inóculo inicial es muy similar, sin embargo, para la cepa ST 2 es de un orden mayor (Tabla 4-1). A pesar del mayor nivel de inóculo, esta cepa tuvo uno de los niveles más bajos de multiplicación *in planta*. A su vez, esta cepa también mostró un bajo nivel de agresividad en función

de los síntomas producidos (Figuras 4-2 y 4-4). En conjunto, estos resultados obtenidos mediante evaluaciones tan diferentes, permiten confirmar el bajo potencial patogénico de esta cepa.

Si comparamos a nivel general los resultados obtenidos mediante qPCR y el ensayo de agresividad, las cepas que presentaron una concentración mayor in planta a los 3 dpi no son exactamente las mismas que indujeron mayor cantidad de síntomas y con mayor rapidez. En el trabajo realizado por Tancos *et al* (2013), las cepas estudiadas no presentaron diferencias en los niveles de colonización pero sin embargo la incidencia de la enfermedad sí variaba según los aislados estudiados. Por lo cual, es de suponer que la colonización y la agresividad no necesariamente están relacionadas, significando que una cepa puede tener alta concentración in planta e inducir pocos síntomas y viceversa. Por otra parte, el ensayo realizado a los 3 dpi no es tan representativo ya que el crecimiento bacteriano puede perfectamente dispararse en los días posteriores, mientras que la evaluación de síntomas realizada durante 29 días permite ver un panorama más general de la evolución de la enfermedad. Para obtener una visión más general de lo que ocurre dentro de la planta una vez que Cmm ingresa al xilema, se debería realizar un seguimiento de las 12 cepas *in planta*, realizando extracciones de ADN periódicas para evaluar la evolución del crecimiento de cada cepa en la planta. Sin embargo, un ensayo de este calibre, requiere mucho tiempo y muchas plántulas, por lo que en este trabajo debió optarse por seleccionar un único tiempo de evaluación. Se debe tener en cuenta también que para el seguimiento y para el análisis comparativo se utilizaron dos variedades de planta de tomate distintas. Si bien estas dos variedades son susceptibles al patógeno, y presentan los síntomas típicos de la enfermedad, se desconoce el proceso y tiempo que lleva a la muerte de la planta en cada variedad. Con lo cual, la selección de 3 dpi para la realización del análisis comparativo, podría no ser el tiempo óptimo para la variedad utilizada. Sin embargo, cabe destacar que existen algunas coincidencias entre los ensayos realizados que cabe destacar a los efectos de identificar las cepas con mayor virulencia a partir de los resultados obtenidos en este estudio. En este sentido, las cepas correspondientes a los STs 6, 8 y 12 fueron las que presentaron mayor capacidad de multiplicación así como síntomas más tempranos y de mayor severidad. Sería interesante estudiar en mayor profundidad estas cepas y compararlas con las cepas identificadas como menos agresivas (ST 2 y ST 3) a los efectos de identificar aspectos relevantes en la virulencia de este patógeno. A su vez, las cepas de mayor agresividad identificadas en este estudio se podrían utilizar para identificar nuevas fuentes de resistencia en el germoplasma de tomate que se encuentra disponible en el Programa de Mejoramiento de Tomate de INIA.

A modo de evaluar un factor de patogenicidad distinto a los previamente evaluados en otros trabajos (Croce, 2016), se seleccionó la capacidad de producción de biofilm. El *biofilm* es un cúmulo de organismos que se adhieren a las superficies (en este caso a los vasos del xilema), que tienen un alto nivel de organización donde la bacteria forma comunidades estructuradas, coordinadas y funcionales (O'Toole *et al.*, 2000). Muchas condiciones, como las propiedades de la superficie y de la interfase, la disponibilidad de nutrientes, la composición de la comunidad microbiana y la hidrodinámica, afectan la estructura del biofilm (Davey y O'Toole, 2000). En el caso de Cmm, la bacteria una vez dentro del xilema forma estructuras *biofilm-like* que ayudan a la colonización de la planta y a su movimiento dentro de la misma (Chalupowicz *et al.*, 2012). Por lo cual, verificar que las cepas encontradas en Uruguay formen biofilm es de vital importancia para este trabajo.

La producción de biofilm fue verificada para los 12 STs de Cmm aislados en Uruguay. Se observa que algunas cepas tienen mayor capacidad de producción de *biofilm* que otras (Figura 4-16). Se verificó que existen diferencias significativas entre las 12 cepas de Cmm. Se observa que la cepa ST 10 produce mayor cantidad de biofilm que el resto, mientras que entre las otras se observan 2 grupos: el primero compuesto por los STs 7, 1, 6, 8, 2 y 3 y el segundo por los STs 4, 11, 5 y 9. El ensayo de placa de microtitulación y tinción con cristal violeta es muy utilizado para la cuantificación de *biofilm* de distintos microorganismos, como ser *Staphylococcus aureus* (Xu *et al.*, 2016). Sin embargo, la capa de biofilm formada se pierde frecuentemente en los pasos de lavado, sobre todo en los casos donde el biofilm se forma en la interfase aire-líquido, resultando en muchos errores en la cuantificación (Syal, 2017). A su vez, este método no es muy reproducible ya que la adhesión a la placa varía según el material de la misma. Otras metodologías que podrían utilizarse es la utilizada por Chalupowicz *et al* (2012), donde se utiliza una cepa de Cmm marcada con la proteína verde fluorescente (GFP) permitiendo su visualización dentro de la planta mediante microscopía confocal, o la planteada por Syal (2017), donde se utiliza un solvente (THF) para la estimación de la producción de biofilm.

La producción de biofilm de los 12 STs no se correlaciona con su capacidad de multiplicarse *in planta* ni con su capacidad de ocasionar síntomas en la planta. Sin embargo, todos estos parámetros evaluados son de vital importancia para que el patógeno provoque la enfermedad en la planta de tomate. Existen cepas que produjeron poca cantidad de biofilm (cepa ST 4) pero sin embargo, provocaron síntomas en la planta y se multiplicaron *in planta* a una concentración intermedia entre los 12 STs. A su vez, existen cepas que no produjeron mucho biofilm, y tampoco presentaron muchos síntomas, pero se multiplicaron mucho *in planta* (cepa ST 9).

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo, se evaluaron diferentes aspectos vinculados a la virulencia de los 12 STs de Cmm encontrados en Uruguay. El trabajo realizado permitió poner a punto diferentes metodologías que podrán ser utilizadas en futuros estudios, incluyendo ensayos con plantas y evaluación de síntomas, la cuantificación absoluta del patógeno en plantas infectadas por qPCR así como ensayos *in vitro* para evaluar la producción de *biofilm*.

Los resultados obtenidos revelaron diferencias significativas entre las cepas de Cmm presentes en Uruguay. Sin embargo, no se encontraron fuertes correlaciones entre los diferentes aspectos evaluados, lo que sugiere que la virulencia de Cmm es un rasgo complejo determinado por múltiples factores.

Entre los resultados obtenidos se destaca la cepa ST 3, que no fue capaz de provocar síntomas en ninguna planta inoculada, a pesar de verificarse que se encontraba viable dentro de la planta. Este hallazgo es interesante y sienta las bases para futuros estudios enfocados a profundizar en las diferencias a nivel genómico que podrían estar explicando este comportamiento endofítico.

El estudio de evaluación de la virulencia de las cepas de Cmm encontradas en nuestro país es importante para evaluar la eficiencia de distintos mecanismos de control de la enfermedad así como la resistencia al patógeno de nuevas variedades de tomate. Las cepas más agresivas identificadas en este estudio podrán ser utilizadas en estudios posteriores con el propósito de evaluar germoplasma con resistencia a esta enfermedad en el marco de un programa de mejoramiento. Esto garantizará que una variedad de tomate que resulte resistente a la cepa con mayor agresividad, sea resistente a todas las demás, así como que un mecanismo de control es eficiente para esta será eficiente para el resto.

7. APÉNDICE

7.1 Medios de cultivo

7.1.1 Medio de cultivo general

Tabla 7-1. Composición del medio Agar caldo-nutriente extracto de levadura (NBY)

Componente	Cantidad
Caldo nutritivo	8,0 g
Extracto de levadura	2,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Bacto Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Se realiza la toma en peso de cada componente y se agrega el volumen correspondiente de agua destilada. Se homogeneiza bien y se ajusta el pH del medio a 7,2. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121 °C y se reparte en placas de Petri de a 20 mL aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las placas se secan a temperatura ambiente y se conservan a 4 °C hasta su uso.

7.1.2 Medio de cultivo semi-selectivo

Tabla 7-2. Composición del medio *Selective Clavibacter michiganensis* (SCM) (Fatmi y Schaad, 1988)

Componente	Cantidad
Sacarosa	10,0 g
Extracto de levadura	0,1 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,5 g
Ácido Bórico	1,5 g
Bacto Agar	15 g
Agua destilada	1000 mL

Se realiza la toma en peso de cada componente y se agrega el volumen correspondiente de agua destilada. Se homogeneiza bien y se ajusta el pH a 7,2. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C, se deja enfriar a 45-50 °C y se agregan los antibióticos que se indican a continuación los cuales fueron previamente esterilizados por filtración.

Tabla 7-3. Antibióticos del medio SCM

Antibiótico	Concentración	Volumen agregado
Cicloheximida	100,0 mg/mL	2,0 mL
Ácido Nalidixico	10,0 mg/mL	1,0 mL
Ácido Nicotínico	10,0 mg/mL	10,0 mL

Se mezcla bien en matraz y se reparte en placas de Petri de a 20 mL aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las placas se secan a temperatura ambiente y se conservan a 4 °C hasta su uso.

7.1.3 Medios de cultivo mínimos

Tabla 7-4 Composición del medio XMM

Componente	Cantidad
NaCl	1,168 g
KNO ₃	2,020 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	1,233 g
Casaminoácidos	2,000 g
Agua destilada	1000 mL

Se realiza la toma en peso de cada componente y se agrega el volumen correspondiente de agua destilada. Se homogeneiza bien. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Se agregan las soluciones que se indican a continuación las cuales fueron previamente esterilizadas por autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

Tabla 7-5 Soluciones del medio XMM

Componente	Concentración	Cantidad
CaCl ₂	1 M	1,0 mL
KH ₂ PO ₄	0,1 M	1,6 mL
K ₂ HPO ₄	0,1 M	3,2 mL
FeSO ₄	10 mM	1,0 mL

Se mezcla bien en matraz y se reparte en tubos de vidrio estériles de a 5 mL aproximadamente. Se conservan a 4 °C hasta su uso.

Tabla 7-5 Composición del medio M9 (Chalupowicz et al., 2010)

Componente	Concentración	Volumen agregado
Sales	-	200 mL
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	1 M	1 mL
CaCl ₂	0,1 M	100 µL
Glucosa	20 %	10 mL
Agua destilada	-	789 mL

La composición de la solución de sales se detalla a continuación.

Tabla 7-6 Composición de la solución de sales del medio M9

Componente	Cantidad
Na ₂ HPO ₄ . 7 H ₂ O	64 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NaCl	2,5 g
NH ₄ Cl	5 g
Agua destilada	1000 mL

Se realiza la toma en peso de cada componente de la solución de sales y se agrega el volumen correspondiente de agua destilada. Luego, se agrega el volumen correspondiente de sales y del resto de los componentes del medio menos la glucosa a un matraz junto con el agua destilada. Se reparte en matraces de 50 mL de a 10 mL y se esterilizan en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. La glucosa se esteriliza por filtración y se agrega posteriormente al autoclavado. Se conservan a 4 °C hasta su uso.

El medio M9 suplementado con 1% de glucosa, es una modificación del medio M9 donde se agregan 50 mL de glucosa en lugar de 10 mL.

7.2 Tablas de valores de C_q de las reacciones de qPCR

Tabla 7.1 - Evaluación del sistema de primers y sonda *Ptssk* (Figura 4-5)

Concentración (eg/μL)	C _q obtenido	C _q promedio
1,88x10 ⁶	19,61	19,24
1,88x10 ⁶	18,86	
1,88x10 ⁵	23,87	23,84
1,88x10 ⁵	23,82	
1,88x10 ⁴	26,45	26,57
1,88x10 ⁴	26,69	
1,88x10 ³	31,10	30,82
1,88x10 ³	30,53	
1,88x10 ²	32,99	32,72
1,88x10 ²	32,44	
1,88x10 ¹	36,20	36,20
1,88x10 ¹	NEG (NTC)	
1,88	NEG (NTC)	38,17
1,88	38,17	
Blanco	NEG (NTC)	
Blanco	NEG (NTC)	

Tabla 7.2 - Evaluación del sistema de primers y sonda MVS21

Concentración (eg/ μ L)	Cq obtenido	Cq promedio
1,88x10 ⁶	18,86	19,24
1,88x10 ⁶	19,61	
1,88x10 ⁵	22,74	22,70
1,88x10 ⁵	22,66	
1,88x10 ⁴	25,21	25,01
1,88x10 ⁴	24,81	
1,88x10 ³	28,47	28,59
1,88x10 ³	28,71	
1,88x10 ²	28,99	29,14
1,88x10 ²	29,29	
1,88x10 ¹	29,81	29,53
1,88x10 ¹	29,26	
1,88	29,46	29,34
1,88	29,21	
Blanco	30,07	29,73
Blanco	29,38	

Tabla 7.3- Evaluación del efecto matriz mediante construcción de curva de calibración en matriz de planta

Concentración (eg/ μ L)	Cq obtenido	Cq promedio
4,354x10 ⁶	17,05	16,98
4,354x10 ⁶	16,91	
4,354x10 ⁵	19,01	19,29
4,354x10 ⁵	19,57	
4,354x10 ⁴	22,37	22,35
4,354x10 ⁴	22,33	
4,354x10 ³	25,29	25,38
4,354x10 ³	25,48	
4,354x10 ²	30,80	30,64
4,354x10 ²	30,49	
4,354x10 ¹	34,65	33,26
4,354x10 ¹	31,86	
4,354	NEG (NTC)	
4,354	NEG (NTC)	
Blanco	NEG (NTC)	
Blanco	NEG (NTC)	

Tabla 7.4- Seguimiento del proceso de infección de una cepa de Cmm en plantas de tomate inoculadas mediante qPCR (Figura 4-11)

Dpi	Cq obtenido	Cq promedio
2 dpi	30,43	29,57
	29,71	
	28,58	
5 dpi	22,52	23,40
	23,38	
	24,30	
9 dpi	23,51	23,02
	22,52	
	23,02	
12 dpi	19,79	20,45
	19,68	
	21,87	

Tabla 7.5- Análisis comparativo de la multiplicación *in planta* de los 12 STs de Cmm

ST	Cq obtenido	Cq promedio
ST 1	29,29	29,93
ST 1	31,06	
ST 1	30,90	
ST 1	28,46	
ST 2	28,75	29,79
ST 2	29,05	
ST 2	29,50	
ST 2	31,85	
ST 3	30,09	29,11
ST 3	28,46	
ST 3	29,54	
ST 3	28,34	
ST 4	28,14	28,08
ST 4	29,07	
ST 4	26,63	
ST 4	28,48	
ST 5	30,47	29,18
ST 5	27,52	
ST 5	29,84	
ST 5	28,88	
ST 6	25,71	25,59
ST 6	25,67	
ST 6	26,02	
ST 6	24,96	
ST 7	28,36	28,33
ST 7	28,16	
ST 7	27,49	
ST 7	29,33	
ST 8	26,01	

ST 8	26,29	24,81
ST 8	23,01	
ST 8	23,94	
ST 9	24,34	
ST 9	24,70	25,81
ST 9	25,14	
ST 9	25,59	
ST 10	29,07	
ST 10	28,92	28,96
ST 10	30,06	
ST 10	27,80	
ST 11	25,71	
ST 11	27,37	27,17
ST 11	27,44	
ST 11	28,16	
ST 12	25,30	
ST 12	27,10	26,00
ST 12	26,19	
ST 12	25,43	
Control	NEG (NTC)	

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G.N.** (2005) Plant pathology Fifth., Florida: Elsevier.
- Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., et al.** (2008) Tomato Transcriptional Changes in Response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Reveal a Role for Ethylene in Disease Development. *Plant Physiol.* **146**, 1797–1809.
- Berendsen, S.M.H., Koenraadt, H., Woudt, B. and Oosterhof, J.** (2011) The development of a specific Real-Time TaqMan for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. In APS-IPPC Meeting, Hawaii.,.
- Bermphohl, A., Dreier, J., Bahro, R. and Eichenlaub, R.** (1996) Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. , 391–399.
- Boudyach, E.H., Fatmi, M., Akhayat, O., Benizri, E. and Ait Ben Aoumar, A.** (2001) Selection of antagonistic bacteria of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and evaluation of their efficiency against bacterial canker of tomato. *Biocontrol Sci. Technol.* **11**, 141–149.
- Burger, A., Gräfen, I., Engemann, J., Niermann, E., Pieper, M., Kirchner, O., Gartemann, K.H. and Eichenlaub, R.** (2005) Identification of homologues to the pathogenicity factor Pat-1, a putative serine protease of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microbiol. Res.* **160**, 417–427.
- Burokiené, D.** (2006) Early detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seedlings. *Agron. Res.* **4**, 151–154.
- Chang R.J., Ries S.M., Pataky J.K.** (1991). Dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathology* **81**:1276-1281.
- Chalupowicz, L., Barash, I., Reuven, M., Dror, O., Sharabani, G., Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R., Sessa, G. and Manulis-Sasson, S.** (2016) Differential contribution of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* virulence factors to systemic and local infection in tomato. *Mol. Plant Pathol.*, n/a-n/a.
- Chalupowicz, L., Cohen-Kandli, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H., Sessa, G., Barash, I. and Manulis-Sasson, S.** (2010) Sequential expression of bacterial virulence and plant defense genes during infection of tomato with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* **100**, 252–261.
- Chalupowicz, L., Zellermann, E.-M., Fluegel, M., et al.** (2012) Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology* **102**, 23–31.
- Costa, J.** (2004) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **22**, 299–305
- Croce, V.** (2012) Desarrollo de nuevos métodos moleculares para la detección de la bacteria fitopatógena *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causante del cancro bacteriano en tomate.
- Croce, V.** (2016) Herramientas moleculares aplicables al control preventivo del cancro bacteriano del tomate en Uruguay.

- Croce, V., Pianzola, M.J., Durand, K., González-Arcos, M., Jacques, M.A. and Siri, M.I.** (2016) Multilocus Sequence Typing reveals high variability among *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains affecting tomato crops in Uruguay. *Eur. J. Plant Pathol.* **144**, 1–13.
- Cui, H., Tsuda, K. and Parker, J.E.** (2015) Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**, 487–511.
- Davey, M.E. and O'toole, G.A.** (2000) Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 847–867.
- De León, L. de, Rodríguez, A., Llop, P., López, M.M. and Siverio, F.** (2009) Comparative study of genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates from the Canary Islands by RAPD-PCR, BOX-PCR and AFLP. *Plant Pathol.* **58**, 862–871.
- De León, L., Siverio, F., López, M. and Rodríguez, A.** (2011) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Dis.* **95**, 1328–1338.
- De León, L., Siverio, F., López, M.M. and Rodríguez, A.** (2008) Comparative efficiency of chemical compounds for in vitro and in vivo activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. *Crop Prot.* **27**, 1277–1283.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W.** InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- EPPO** (2016) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*
- Fatmi, M. and Schaad, N.W.** (2002) Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathol.* **51**, 149–154.
- Flügel, M., Becker, A., Gartemann, K.H. and Eichenlaub, R.** (2012) Analysis of the interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with its host plant tomato by genome-wide expression profiling. *J. Biotechnol.* **160**, 42–54.
- Frenkel, O., Bornestein, M., Shulhani, R., Sharabani, G., Sofer, M., Abo-Moch, F., Lofthouse, M., Manulis-Sasson, S. and Shtienberg, D.** (2016) Secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in nurseries and the conditions leading to infection of tomato seedlings. *Eur. J. Plant Pathol.* **144**, 569–579.
- Gartemann, K.H., Abt, B., Bekel, T., et al.** (2008) The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J. Bacteriol.* **190**, 2138–2149.
- Gartemann, K.H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R. and Burger, A.** (2003) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: First steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *J. Biotechnol.* **106**, 179–191.
- Gleason, M., Gitaitis, R. and Ricker, M.** (1993) Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. *Plant Dis.* **77**, 1069–1076.
- Hausbeck, M.K., Bell, J., Medina-Mora, C., Podolsky, R. and Fulbright, D.W.** (2000) Effect of Bactericides on Population Sizes and Spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomatoes in the Greenhouse and on Disease Development and Crop Yield in the Field. *Phytopathology* **90**, 38–44.

- ISF (2015). "Method for the Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomato Seed".
- Jacques, M.-A., Arlat, M., Boulanger, A., et al. (2016) Using Ecology, Physiology, and Genomics to Understand Host Specificity in *Xanthomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **54**, 163–187.
- Jacques, M.-A., Durand, K., Orgeur, G., et al. (2012) Phylogenetic analysis and polyphasic characterization of *Clavibacter michiganensis* strains isolated from tomato seeds reveal that nonpathogenic strains are distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 8388–402.
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R. and Eichenlaub, R. (2000) The endo-beta-1,4-glucanase CelA of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt of tomato. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **13**, 703–714.
- Kaup, O., Gräfen, I., Zellermann, E.-M., Eichenlaub, R. and Gartemann, K.-H. (2005) Identification of a tomatinase in the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **18**, 1090–1098.
- Kawaguchi, A. and Tanina, K. (2014) Genetic groups of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* identified by DNA fingerprinting and the effects of inoculation methods on disease development. *Eur. J. Plant Pathol.* **140**, 399–406.
- Lasa, C.I., Abiko, K., Tezuka, N., Inaba, T. y García, S. (1981) Algunas enfermedades que afectan actualmente los cultivos de hortalizas en Uruguay. *Investig. Agronómicas. Uruguay Año 2*, 97–100.
- Ling, A.S.C, Kamil, M.J.A., Chong, K.P. and Ho, C.M.. (2017) Assesing the cocoa genotypes for resistance to black pod using de area under the disease-progress curve (AUDPC). *Bulg.J,Agric. Sci.*, **23**, 972–979.
- Maeso, D. and Walasek, W. (2012) Evaluación de métodos para desinfectar semillas de tomate contra cancro bacteriano (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). *Agrociencia Uruguaya* **16**, 134–141.
- Maeso, D., Walasek, W. y Fernández A. (2015a) Evaluación de desinfectantes para prevenir la transmisión de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate mediante tijeras de poda. Serie Actividades de Difusión Nro 756, INIA Las Brujas.
- Maeso, D., Fernández, A. y Walasek, W. (2015b) Evaluación de productos a base de *Bacillus subtilis*, inductores de resistencia y otros aplicados a follaje para el control del cancro bacteriano del tomate, temporada 2014-2015. Serie Actividades de Difusión Nro 756, INIA Las Brujas.
- Maiden, M., Bygraves, J., Feil, E., et al. (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 3140–3145.
- MGAP-DIEA (2016) Estadístico Agropecuario.
- MGAP/ DIGESAA (2010) Listado de plagas cuarentenarias para Uruguay.
- Milijašević-Marčić, S., Gartemann, K.-H., Frohwitter, J., Eichenlaub, R., Todorović, B., Rekanović, E. and Potočnik, I. (2012) Characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Serbia. *Eur. J. Plant Pathol.* **134**, 697–711.

- Oh, E., Bae, C., Lee, H., et al.** (2016) *Clavibacter michiganensis* subsp. *capsici* subsp. nov., causing bacterial canker disease in pepper, 4065–4070.
- O'Toole G.** (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. JoVE. 47. <http://www.jove.com/details.php?id=2437>, doi: 10.3791/2437
- O'Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R.** (2000) Biofilm formation as microbial development, 49–79.
- Ricchi, M., Bertasio, C., Boniotti, M.B., Vicari, N., Russo, S., Tilola, M., Bellotti, M.A. and Bertasi, B.** (2017) Comparison among the quantification of bacterial pathogens by qPCR, dPCR, and cultural methods. *Front. Microbiol.* **8**, 1–15.
- Sambrook J. and D.W. Russell.** (2001). *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 3th ed. Cold Spring Harbor, NY. Vol. 3. Appendix 1.
- Savidor, A., Chalupowicz, L., Teper, D., Gartemann, K.H., Eichenlaub, R., Manulis-Sasson, S., Barash, I. and Sessa, G.** (2014) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Vatr1 and Vatr2 transcriptional regulators are required for virulence in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2014 27**, 1035–1047.
- Savidor, A., Teper, D., Gartemann, K.H., et al.** (2012) The *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* -tomato interactome reveals the perception of pathogen by the host and suggests mechanisms of infection. *J. Proteome Res.* **11**, 736–750.
- Schaad N. W., Jones J. B., and Chun W.** (2001). *Laboratory Guide for Plant Pathogenic Bacteria*. St. Paul, MN, USA: APS Press.
- Sen, Y., Feng, Z., Vandenbroucke, H., Wolf, J., Visser, R.G.F. and Heusden, a. W.** (2012) Screening for new sources of resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) in tomato. *Euphytica* **190**, 309–317.
- Sen, Y., Wolf, J. van der, Visser, R.G.F. and Heusden, a. W. van** (2015) Bacterial Canker of Tomato: Current Knowledge of Detection, Management, resistance and Interactions. *Plant Dis.* **99**, 4–13.
- Soylu, S., Baysal, O. and Soylu, E.M.** (2003) Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S methyl (ASM) against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. *Plant Sci.* **18**, 149–156.
- Spoel, S.H. and Dong, X.** (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 89–100.
- Strahsburger, E., Retamales, P., Estrada, J. and Seeger, M.** (2016) Microdot method: used with chromogenic agar is a useful procedure for sanitary monitoring in aquaculture. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* **44**, 742–749.
- Sueno, W.S.K., Alvarez, A.M. and Ingram, D.M.** (2015) Bacterial canker: Impact of seed-borne inoculum on plant infection in greenhouse tomatoes. *Acta Hort.* **1069**, 301–308.
- Syal, K.** (2017) Novel Method for Quantitative Estimation of Biofilms. *Curr. Microbiol.* **74**, 1194–1199.
- Tancos, M.A., Lange, H.W. and Smart, C.D.** (2015) Characterizing the Genetic Diversity of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Population in New York. **105**, 169–179.
- Tlatilpa Santamaría, M.I.** (2010) Estrategias de manejo de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en Jitomate. *Model. Econ. Mens. para el Merc. carne Bov. en canal y cortes al Consum. en México, 1995-2003*, 195.

- Van Heusden, a. W., Koornneef, M., Voorrips, R.E., Brüggemann, W., Pet, G., Vrielink-van Ginkel, R., Chen, X. and Lindhout, P.** (1999) Three QTLs from *Lycopersicon peruvianum* confer a high level of resistance to *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Theor. Appl. Genet.* **99**, 1068–1074.
- Werner, N. a, Fulbright, D.W., Podolsky, R., Bell, J. and Hausbeck, M.K.** (2002) Limiting Populations and Spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Seedling Tomatoes in the Greenhouse. *Plant Dis.* **86**, 535–542.
- Xu, Z., Liang, Y., Lin, S., Chen, D., Li, B., Li, L. and Deng, Y.** (2016) Crystal Violet and XTT Assays on *Staphylococcus aureus* Biofilm Quantification. *Curr. Microbiol.* **73**, 474–482.
- Yeh, Shi-Tao,** 2002. Using trapezoidal rule for the area under a curve calculation. *SUGI 27 Proceedings*, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Zaluga, J., Vaerenbergh, J. Van, Stragier, P., Maes, M. and Vos, P. De** (2013) Genetic diversity of non-pathogenic *Clavibacter* strains isolated from tomato seeds. *Syst. Appl. Microbiol.* **36**, 426–435.

Agradecimientos

En primer lugar, le quiero agradecer a María Inés, por apoyarme y motivarme durante todo el trabajo de tesina. Gracias por aconsejarme, ayudarme y estar siempre a mi disposición, incluso cuando mis horarios no eran tan flexibles.

Le quiero agradecer a Vale, por estar siempre dispuesta a ayudarme con la mejor onda y a enseñarme todo lo necesario para poder llevar a cabo esta tesina. Gracias por la infinita paciencia, por los consejos y el compañerismo.

Otro agradecimiento especial es para María Julia, por abrirme las puertas del laboratorio de Microbiología Molecular y haberme dado la oportunidad de trabajar en el grupo.

A la Cátedra de Microbiología, por crear un lindo ambiente de trabajo y por todos los momentos compartidos. A todos mis compañeros del 12 por estar siempre dispuestos a ayudarme, por todos los favores y por la buena onda. También quiero agradecerle a Gianna y a Sonia por sus consejos y por compartir sus conocimientos.

A los de siempre, Pau, Juli, Benni, Guille, Fede, Monte y Juan por todos estos años juntos, por estar conmigo en las buenas y en las malas. Gracias por formar parte de mi vida y ser los mejores. A Clo y Maru, por estar orgullosas de mí, motivarme y apoyarme incondicionalmente.

A Mer, Flo, Dani y Lu, quienes en estos años de Facultad se convirtieron en grandes amigas, por aguantarme durante toda la carrera, no dejarme bajar los brazos en ningún momento y hacer que todos los estudios fueran más llevaderos y divertidos. Al resto de mis compañeros de Facultad por todas las experiencias compartidas. Quiero agradecerle especialmente a Lu Vignale, Seba, Matías y Felipe por aguantar mi estrés y ser una compañía excepcional.

A mis hermanas de la vida, Luli y Gabi por, a pesar de la distancia, tenerme siempre presente. Gracias por escucharme y aconsejarme siempre.

A mis padres, por aconsejarme siempre aún sin entender mucho de lo que hago, por compartir conmigo sus experiencias. A Vero, por su apoyo incondicional, por escucharme siempre y ser mi gran compañera. A Ale, por todos los consejos y por cumplir el rol de hermano. A Nico y Mar, por estar conmigo a pesar de la distancia y transmitirme todo el cariño.

A todos ustedes, por estar conmigo durante los momentos más conflictivos del estudio. Muchas gracias.