



Tesina de grado
Licenciatura en Bioquímica

**Análisis comparativo de cepas de *Clavibacter michiganensis*
con virulencia diferencial en plantas de tomate**

Florencia Alcoba

Tutora: Dra. María Inés Siri

Co-tutora: Dra. Virginia Ferreira

Laboratorio de Microbiología Molecular
Área Microbiología, Departamento de Biociencias
Facultad de Química, Universidad de la República.
Montevideo, Uruguay

Septiembre 2022

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a María y Virginia, por todo el aprendizaje y confianza depositada en mí. Hicieron que todo el trabajo fuera más lindo gracias a su apoyo y cariño.

A María Morel, por aceptar la evaluación de mi trabajo, y por sus aportes al mismo.

A toda la cátedra de Microbiología, por estar siempre que necesité una mano o consejo. Particularmente quiero agradecer a mis compañeros del 12, los cuales tuve la gran suerte de que me acompañen, gracias por su disposición para ayudarme siempre que lo necesité.

A Pablo González, por su ayuda con los análisis estadísticos, y Marcela González, por brindarme las plantas para mis ensayos.

A Alan Yañez y Paco Barona por brindarme ayuda con mis genomas.

A mis padres, cuyo apoyo es y ha sido un pilar en mis logros. Gracias por siempre haber confiado en mí y alentarme a cumplir mis metas.

A mi familia que a pesar de no entender qué hago, siempre alientan mis logros por más pequeños que sean.

A mis hermanos Fede y Luli, quienes son mi motor para seguir mejorando y creciendo.

A mis amigos, quienes siempre me apoyaron, alentaron y preocuparon por mí, que no me falten nunca.

A Lucas, gracias por apoyarme en todo momento y levantarme cuando me caigo, sin vos no sería lo mismo.

RESUMEN

Clavibacter michiganensis (Cm) es la bacteria causante del cancro bacteriano del tomate, una de las más importantes enfermedades que afectan la producción de este cultivo en todas las regiones productoras del mundo. Estudios previos basados en el análisis filogenético de este patógeno, permitieron agrupar a las cepas presentes en Uruguay en 12 secuenciotipos (STs), determinando además la existencia de cepas con virulencia diferencial en tomate. Sin embargo, no se conoce si estas cepas presentan repertorios genéticos diferentes que podrían explicar estos niveles contrastantes de virulencia. El objetivo de este trabajo fue confirmar y profundizar en la caracterización de la virulencia de cuatro cepas de Cm pertenecientes a diferentes STs, y evaluar la existencia de genes asociados al nivel de virulencia en tomate mediante un abordaje genómico. Para esto, se realizaron dos ensayos de inoculación de Cm en plantas de tomate utilizando tres métodos diferentes (punción en tallo, corte con tijeras y asperjado de raíces). En ambos ensayos y para todos los métodos de inoculación utilizados, la cepa MAI 1001 mostró una nula o muy baja agresividad en tomate, con una amplia predominancia de plantas asintomáticas. Este comportamiento es notoriamente diferente al observado para las otras cepas de Cm evaluadas, que fueron capaces de producir síntomas típicos de cancro bacteriano en todas las plantas inoculadas, destacándose a la cepa MAI 1009 como la más agresiva. También se verificó mediante recuento en microgota, que la cepa MAI 1001 a pesar de no desarrollar síntomas es capaz de colonizar los diferentes tejidos de la planta, diseminarse y multiplicarse activamente a nivel del xilema alcanzando concentraciones entre 10^4 - 10^9 ufc/g. En cuanto a los métodos evaluados, la inoculación por asperjado de raíces se caracterizó por presentar una mayor variabilidad entre réplicas de un mismo tratamiento y por generar un menor desarrollo de síntomas de marchitamiento.

Por último, se secuenciaron y ensamblaron los genomas de las cuatro cepas analizadas previamente, y una cepa más (MAI 1018), para analizar las diferencias genómicas entre ellas y ver si éstas se correlacionan con las diferencias observadas a nivel de virulencia. La secuenciación se realizó mediante tecnología Illumina y Nanopore. Se generaron ensamblados híbridos de buena calidad, se anotaron y se realizaron múltiples análisis comparativos que permitieron evaluar el repertorio genético de cada cepa. No se encontraron diferencias sustanciales en los repertorios de genes de virulencia previamente reportados. Sin embargo, se identificaron tres genes de función desconocida de origen plasmídico (pCM2) que están presentes en todas las cepas agresivas y ausentes en la cepa MAI 1001. Estos genes constituyen buenos candidatos como nuevos factores de virulencia en los cuáles se continuará profundizando.

Palabras clave: *Clavibacter michiganensis*, bacteria fitopatógena, genómica comparativa

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
ABCPE	Área bajo la curva de progresión de la enfermedad
ANI	Average Nucleotide Identity
ANOVA	Análisis de varianza
ARR	Age-related resistance
AUDPC	Área bajo la curva de progresión de la enfermedad
CBD	Dominio de unión a carbohidratos
CD	Dominio celulasa
Cm	<i>Clavibacter michiganensis</i>
cm	Centímetro
DAMPs	Damage-associated molecular patterns
dDDH	Hibridación ADN-ADN digital
dpi	Días post inoculación
ED	Dominio expansina
Eq	Equivalentes
g	Gramo
IPA	Isla de patogenicidad
Mb	Mega bases
MLSA	<i>Multilocus Sequence Analysis</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
mL	Mililitro
ONT	Oxford Nanopore Technologies
pb	Pares de bases
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
SBS	<i>Sequencing by synthesis</i>
SP	Péptido señal
ST	Secuenciotipo
subsp.	Subespecie
ton	Tonelada
ufc	Unidades formadoras de colonias
μL	Microlitro

Índice de Contenidos

1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1. <i>Cancro bacteriano del tomate</i>	7
1.1.1. Antecedentes, importancia y distribución.	7
1.1.2. Diseminación y ciclo de la enfermedad	7
1.1.3. Sintomatología	9
1.1.4. Estrategias de manejo de la enfermedad	11
1.2. <i>El patógeno: Clavibacter michiganensis</i>	13
1.2.1. Características generales y clasificación taxonómica.....	13
1.2.2. Características genómicas generales	14
1.2.3. Genes involucrados en la virulencia y patogenicidad	16
1.3. <i>Interacción planta – patógeno</i>	19
1.3.1. Mecanismos de colonización de <i>C. michiganensis</i>	19
1.3.2. Mecanismos de defensa de la planta de tomate frente a <i>C. michiganensis</i>	20
1.4. <i>Análisis genómicos, pan-genómicos y tecnologías next generation sequencing (NGS).</i>	21
1.5. <i>Antecedentes en Uruguay</i>	24
1.5.1. Producción de tomate en Uruguay	24
1.5.2. Estudios previos sobre el cancro bacteriano en Uruguay	25
2. HIPÓTESIS	28
3. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO	28
3.1. <i>Objetivo general</i>	28
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	28
3.3. <i>Estrategia de trabajo</i>	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS	30
4.1. <i>Cepas y condiciones de cultivo</i>	30
4.2. <i>Inoculación de plantas de tomate</i>	30
4.3. <i>Evaluación de la virulencia de las cepas de C. michiganensis</i>	32
4.4. <i>Determinación de infecciones latentes por recuento en microgota</i>	32
4.5. <i>Análisis estadístico</i>	33

4.6. Análisis genómico de cepas de <i>C. michiganensis</i>	33
4.6.1 Extracción de ADN genómico	34
4.6.2. Secuenciación de ADN genómico.....	34
4.6.3. Análisis bioinformático.....	35
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.1. Cepas de <i>C. michiganensis</i> con agresividad diferencial en tomate	37
5.2. Análisis genómico comparativo de cepas de <i>C. michiganensis</i> con virulencia diferencial en tomate	44
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	54
7. REFERENCIAS	55
8. APÉNDICE	62
8.1. Genes de virulencia de <i>C. michiganensis</i>	62
8.2. Medios de cultivo.....	65
8.2.1. Medio de cultivo general	65
8.2.2. Medio de cultivo semiselectivo.....	65
8.3. Buffers.....	66
8.3.1. Buffer TBE 10X.....	66
8.3.2. Buffer TE25S	66
8.4. Resultados	66
8.4.1. Análisis estadístico de ambos experimentos	66
8.4.2. Análisis estadístico de los datos del experimento 1	67
8.4.3. Análisis estadístico de los datos del experimento 2	71
8.4.4. Ensayo de latencia de MAI 1001	76
8.5. Análisis bioinformático	76
8.5.1. Curvas de porcentaje GC de las lecturas obtenidas por Nanopore	76
8.5.2. Curvas de porcentaje GC de las lecturas obtenidas por Illumina.....	79

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Cancro bacteriano del tomate*

1.1.1. *Antecedentes, importancia y distribución.*

El cancro bacteriano es una enfermedad que afecta las plantas de tomate y es generada por la actinobacteria gram-positiva *Clavibacter michiganensis*.

Se estiman pérdidas desde 10 a 100% de la producción, lo cual varía según el método de cultivo, el tipo de cultivar, la ubicación y el estado fenológico de las plantas al ser infectadas (Wang et al., 2022). Esta enfermedad genera, por ende, grandes impactos económicos que son reconocidos en todas las regiones del mundo en las que se produce este cultivo (de León et al., 2011; Nandi et al., 2018; Peritore-Galve et al., 2021; Sen et al., 2015).

El primer reporte científico fue documentado por Erwin Smith en los 90's, donde se informaba sobre un brote ocurrido en Michigan, Estados Unidos (Peritore-Galve et al., 2021; Smith, 1910). Desde entonces, han ocurrido numerosos brotes alrededor del mundo, convirtiéndose así esta enfermedad en un problema para los productores de tomate, generando grandes pérdidas económicas. (Frenkel et al., 2016; Peritore-Galve et al., 2021; Ramponi, 2018). En la Unión Europea Cm está categorizado como "peste regulada no cuarentenaria", estableciéndose condiciones estrictas para evitar su propagación a través de semillas y material de siembra (Reglamento (UE) 2016/2031) En Uruguay, este patógeno no es considerado cuarentenario ni está sujeto a regulaciones fitosanitarias y es un patógeno presente el sistema productivo (Croce et al., 2016).

1.1.2. *Diseminación y ciclo de la enfermedad*

La principal vía de diseminación de este patógeno es a través de las semillas, ya sea porque contienen la bacteria en su interior tras haber estado presente Cm en el sistema vascular de la planta femenina que la produjo, o por contener la misma en el exterior por haber entrado en contacto con Cm a través de otras fuentes de contaminación (Fatmi & Schaad, 1988; Quesada-Ocampo et al., 2012). Las semillas pueden contener desde 100 a 1000 unidades formadoras de colonia (UFC) cada una, requiriéndose solamente 100 UFC como mínimo para inducir la enfermedad (de León et al., 2011; Fatmi & Schaad, 1988; Hadas et al., 2005).

A través del ingreso de la bacteria por medio de las semillas, o heridas profundas en tallos o raíces, es que se genera la infección sistémica, donde Cm invade los tejidos vasculares y genera así los síntomas típicos de este tipo de infección (Chalupowicz et al., 2017). Cuando la bacteria ingresa por medio de tricomas,

aperturas naturales (por ej. estomas e hidátodos o pequeñas lesiones en hojas), flores o frutos, se genera una infección localizada; en este caso los síntomas son leves (Carlton et al., 1998; de León et al., 2011; Tancos et al., 2013). Estas infecciones localizadas, pueden llevar a infecciones sistémicas (Wang et al., 2022).

Los restos de plantas y el suelo contaminado, así como las prácticas manuales como riego y poda pueden transmitir la bacteria entre plantas (Hadas et al., 2005; Ramponi, 2018). Se ha reportado que las prácticas culturales pueden diseminar el patógeno incluso previamente a la aparición de síntomas. Las plantas infectadas pueden diseminar el patógeno tras 2 días de haber sido infectadas (Gitaitis et al., 1991). En los restos de plantas, esta bacteria puede sobrevivir entre 7 y 26 meses si se encuentra en la superficie del suelo, mientras que, si los restos están enterrados al menos 10 cm por debajo de la superficie, sobrevive entre 7 y 18 meses (Chang et al., 1992; Fatmi & Schaad, 2002; Gleason et al., 1991). En el suelo, *Cm* sobrevive solamente 3 a 4 semanas (Basu, 1970; Gleason et al., 1991; Peritore-Galve et al., 2021). Las temperaturas cálidas reducen este tiempo de sobrevivencia (Fatmi & Schaad, 2002).

El patógeno puede también introducirse en campos sanos, por medio de material infectado y lluvia contaminada a través del viento por otros cultivos infectados (Chang et al., 1992; de León et al., 2011; Gleason, 1993; Gleason et al., 1991; Sen et al., 2015).

Si la bacteria llega a colonizar la fruta, además de afectar la producción, puede generar nuevos brotes si las semillas se infectan (Tancos et al., 2013). Las semillas pueden infectarse a través del xilema en una infección sistémica o a través de lesiones en la fruta (Tancos et al., 2013).

Teniendo esto en cuenta, podemos identificar un ciclo en la transmisión de la enfermedad (Figura 1-1), y sitios donde puede estar el patógeno: semillas, viveros de producción de plantines para luego trasplantar al campo y sitios de producción de tomate (de León et al., 2011). Cuando el patógeno se encuentra en las semillas, *Cm* se puede diseminar fácilmente ya que allí alcanza diferentes sitios donde luego serán plantadas estas semillas, los cuales pueden ser libres del patógeno y así generar un brote (de León et al., 2011). Además, por las prácticas culturales se puede dar una diseminación hacia los plantines que surgieron de semillas sanas, esto puede ocurrir tanto en invernaderos o campo para la producción de tomate (de León et al., 2011).

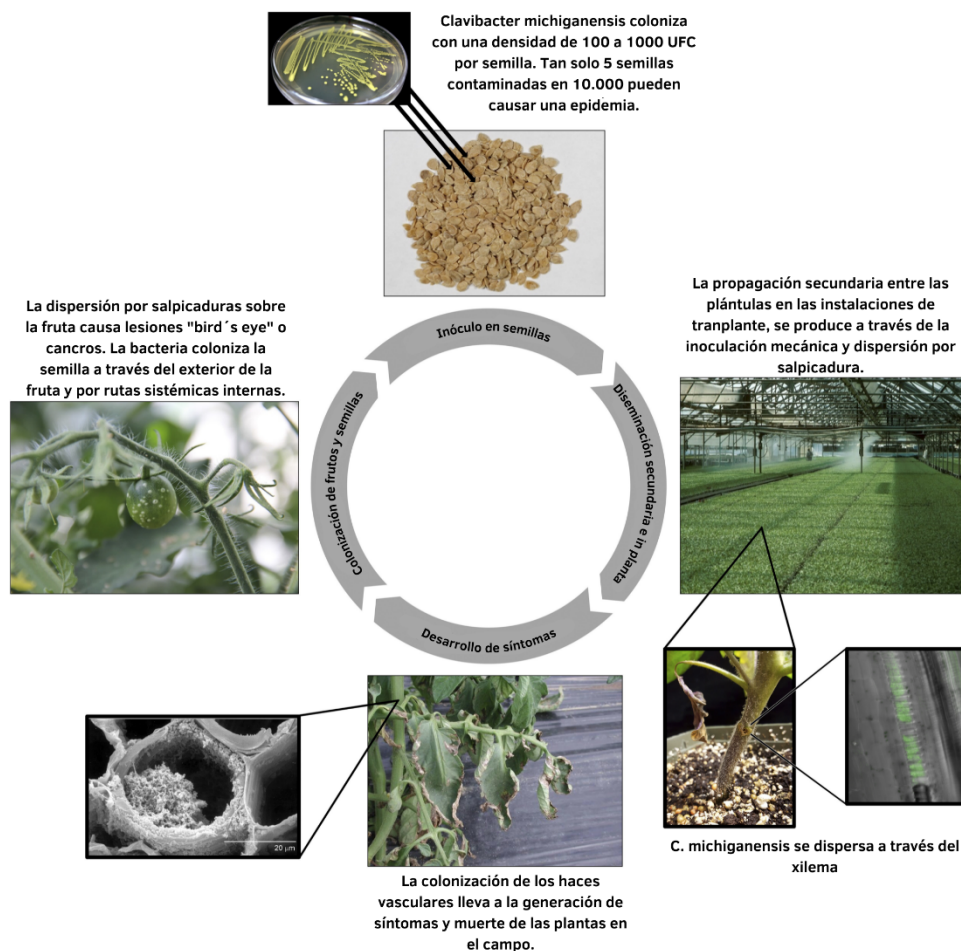


Figura 1-1. Formas de diseminación y ciclo infeccioso de *Clavibacter michiganensis* en las plantas de tomate. Esquema adaptado de Peritore-Galve et al. (2021).

1.1.3. Sintomatología

Los síntomas que Cm genera sobre las plantas varían según si la infección es sistémica o localizada, la edad y resistencia de la planta de tomate, virulencia de la cepa que infecta y condiciones ambientales (Gleason, 1993). Se ha reportado, que existe un período de vulnerabilidad que va desde el momento de trasplante hasta el estadio de 17 a 18 hojas, fuera del cual, al inocularse las plantas de tomate con Cm, éstas presentan síntomas, pero no se marchitan o mueren. Se observa el efecto de la edad de la planta en la sintomatología y avance de la enfermedad, hipotetizándose la existencia de una mayor respuesta defensiva por parte de las plantas de tomate mayores, que contienen una mayor resistencia relacionada con la edad (ARR, Age-related resistance) (Sharabani et al., 2013). En este caso, puede no verse afectada la producción, pero si generar una fuente de diseminación de la enfermedad para cultivos futuros (Sharabani et al., 2013). En este sentido, la susceptibilidad relacionada con la edad de la planta se ve

aumentada cuando las hojas son jóvenes, porque éstas tienen una mayor densidad de tricomas, lo que las hace más vulnerables a infectarse (Goto, 2012).

En las infecciones sistémicas, las plantas pueden ser inicialmente asintomáticas hasta las seis a ocho semanas desde la infección, cuando alcanzan números de entre $10^9 - 10^{10}$ bacterias por gramo de homogenizado tisular (Gitaitis et al., 1991; Meletzus et al., 1993).

Al lograr proliferar en el tejido vascular, Cm causa oscurecimiento y degradación de los tejidos vasculares de la planta (Nandi et al., 2018). Esto interfiere con el transporte de agua y genera marchitamiento en las etapas tempranas de la infección (Eichenlaub & Gartemann, 2011).

Cuando la infección es sistémica, se produce marchitamiento de la planta, donde, en etapas tempranas, suele observarse solo en una mitad de las hojas y también, menos frecuentemente, pueden verse canchros en los tallos (de León et al., 2011). En la Figura 1-2 se pueden observar los síntomas característicos de este tipo de infección.

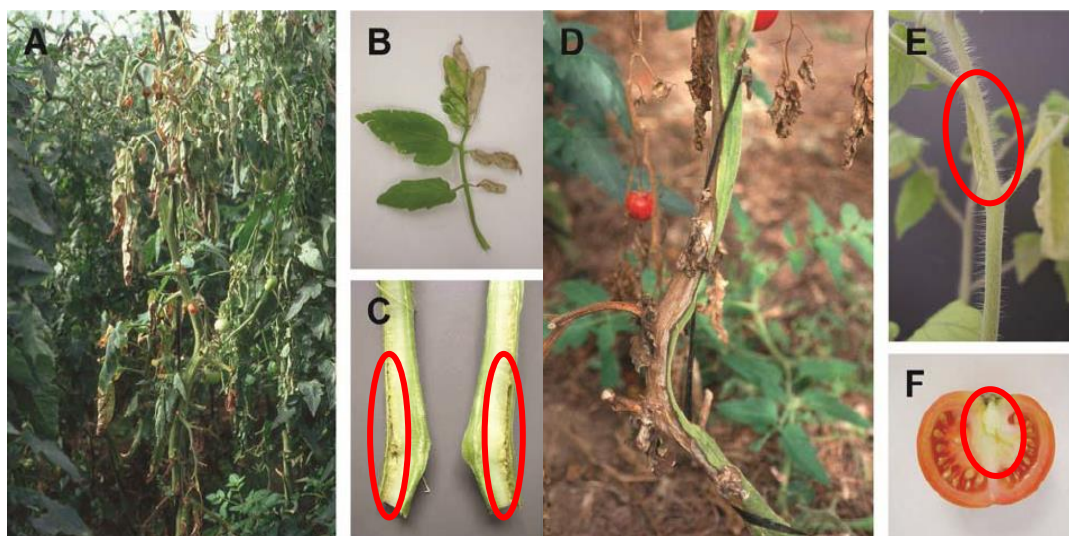


Figura 1-2. Infección sistémica causada por *Clavibacter michiganensis* en plantas de tomate. A. Marchitamiento generalizado, B. Marchitamiento y necrosis unilateral, C. Fragmento de sistema vascular invadido por el patógeno, D. Cancros en tallos en estadios avanzados de la enfermedad, E. Exudados bacterianos liberados por apertura del tallo F. Tomate infectado por Cm. Fuente: de León et al., 2011.

Si la infección es localizada, los síntomas son más leves y se puede producir desde necrosis en los bordes de las hojas (más frecuentemente) o lesiones tipo “blíster” hasta lesiones o canchros en forma de ampollas en los tallos. En los frutos se pueden observar típicamente lesiones en forma de puntos llamadas lesiones tipo “bird’s eye”, aunque son menos frecuentes (Chalupowicz et al., 2017; de León et al., 2011). En la Figura 1-3 se detallan los síntomas característicos de este tipo de infección.

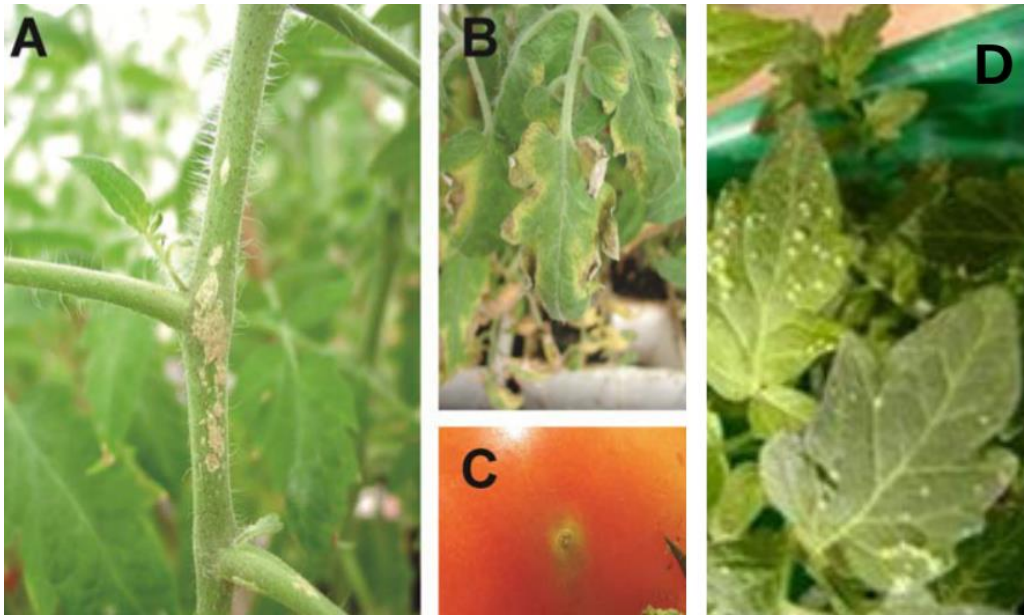


Figura 1-3. Infección localizada causada por *Clavibacter michiganensis* en plantas de tomate. A. Lesiones o canchros en tallo y pecíolo, B. Necrosis marginal en hojas C. Síntomas típicos en los frutos, lesiones tipo “bird’s-eye”, D. lesiones tipo “blíster”. Fuente: de León et al., (2011), Chalupowicz L. et al., (2017).

1.1.4. Estrategias de manejo de la enfermedad

Debido a las formas de diseminación de Cm, es crucial el control mediante prácticas culturales y cuidado de la salud de las plantas para lograr una mayor resistencia a la enfermedad (Nandi et al., 2018). Existen cultivares comerciales resistentes (H1301, H1307 y H1418), pero tienen su uso restringido por una patente de Heinz Company (Wang et al., 2022).

El uso de semillas certificadas libres de patógeno y la esterilización del equipamiento utilizado en la producción y rotación de cultivos, también han sido efectivos en la prevención del cancro bacteriano (de León et al., 2011). De hecho, desde el 2009 existe un consorcio internacional, llamado “*The Good Seed and Plant Practices*” (GSPP, www.gspp.eu), que fue fundado a modo de prevenir los brotes de Cm a través de auditorías como forma de vigilancia y prevención. Estas auditorías buscan hacer las cadenas de producción de tomate más seguras, además de proveer estándares que pueden seguirse, lo cual disminuye los riesgos de que se genere un brote (Peritore-Galve et al., 2021).

Se ha focalizado el trabajo en el diagnóstico, siendo crucial el testeo de semillas debido a que son la fuente principal de diseminación de este patógeno, haciéndolo a largas distancias (Nandi et al., 2018). Para ello, se han utilizado métodos como el aislamiento en medios de cultivo selectivos y semi-selectivos, técnicas serológicas y moleculares (de León et al., 2011; Nandi et al., 2018; Sen et al., 2015). Estas últimas, se han desarrollado últimamente gracias al avance en la secuenciación de genomas (Thapa et al., 2020).

También se han evaluado agentes químicos de control aplicados sobre semillas, plantas o suelos (Nandi et al., 2018). Entre ellos, encontramos compuestos cúpricos que pueden aplicarse sobre las plantas sintomáticas y otros bactericidas como la estreptomycin, que se pueden aplicar de forma preventiva o luego de que las plantas presentan síntomas (de León et al., 2011; Nandi et al., 2018). También se han reportado otros métodos que tampoco han demostrado ser efectivos, como el tratamiento de semillas con nitrito acidificado o ácido hidroclicóric al 1% y el tratamiento del suelo con formaldehído. En resumen, la aplicación de químicos agrícolas o antibióticos tiene como obstáculos asociados la afectación del medioambiente, la aparición de microorganismos resistentes y asuntos regulatorios que limitan su implementación (Nandi et al., 2018).

Existen formas de control biológico, como microorganismos o virus que producen sustancias antimicrobianas o parasitan el patógeno limitando su crecimiento, así como también, pueden hacerlo mediante la inducción de las defensas de la planta (Grady et al., 2016). El uso de bacteriófagos como agentes de control biológico se ha explorado pero los resultados han sido variables, por lo que aún no se han demostrado su efectividad para el control de esta enfermedad (Svircev et. al., 2018).

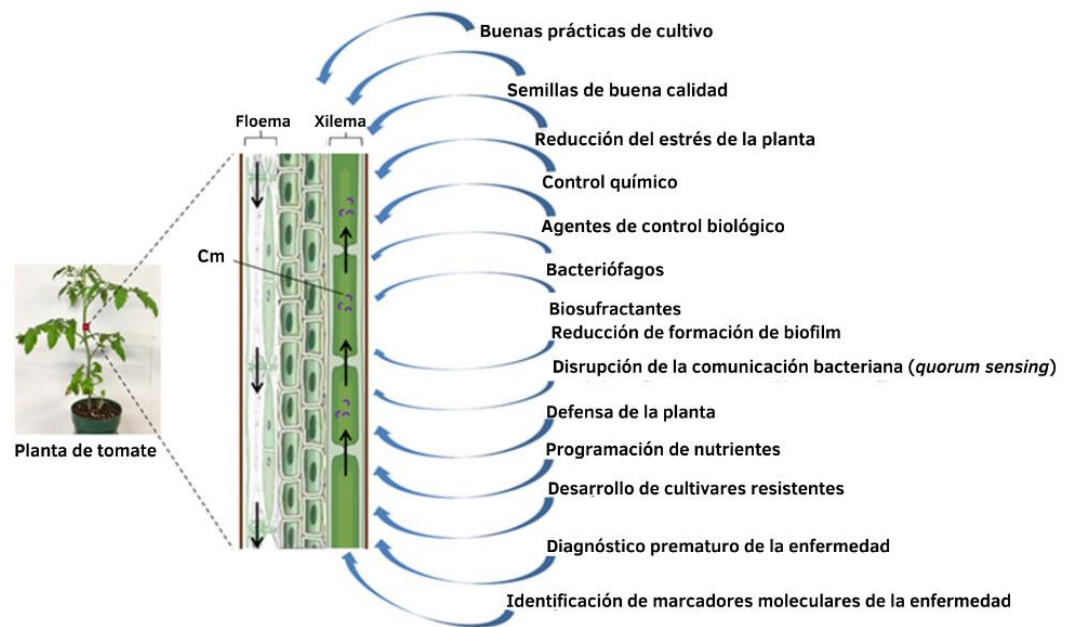


Figura 1-4. Estrategias de manejo del cancro bacteriano del tomate. Adaptado de Nandi et al., (2018)

1.2. El patógeno: *Clavibacter michiganensis*

1.2.1. Características generales y clasificación taxonómica

Cm es un bacilo gram positivo, de crecimiento aeróbico, no móvil, productor de cápsula y que no produce espora (Agrios, 2005). En medios de cultivo nutrientes típicamente crece formando colonias de color amarillo, mucoides, lisas, brillantes, y redondas con el borde entero (Schaad et. al., 2001).

Esta bacteria fitopatógena, previamente conocida como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, fue ascendida al rango taxonómico de especie junto a otras bacterias de su género. Originalmente, Cm se clasificó como *Bacterium michiganense* y poco tiempo después fue renombrado como *Aplanobacter michiganense* (Bryan, 1930; Peritore-Galve et al., 2021; Smith, 1910, 1914). Años después se reclasificó como *Corynebacterium michiganense* para luego pasar a formar parte del género actual *Clavibacter* (Collins & Jones, 1980; Davis et al., 1984; Peritore-Galve et al., 2021).

Dentro de la especie *C. michiganensis*, se encontraban seis subespecies de patógenos de plantas: *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *C. michiganensis* subsp. *tessellarius* y *C. michiganensis* subsp. *phaseoli*; las cuales fueron ascendidas a especies por análisis de genoma completo y secuenciación multilocus (Li et al., 2018; Peritore-Galve et al., 2021). El género *Clavibacter* está actualmente compuesto por *C. michiganensis*, *C. insidiosus*, *C. nebraskensis*, *C. sepedonicus*, *C. tessellarius*, *C. phaseoli* y recientemente también *C. capisci* (Li et al., 2018). En la Tabla 1-1, se muestra la actual taxonomía del género *Clavibacter*.

Tabla 1-1. Reclasificación de las especies del género *Clavibacter*, enfermedad generada y cultivos afectados por cada una. Adaptado de Méndez et al., (2020); Peritore-Galve et al., (2021).

Subespecie	Enfermedad	Cultivo afectado	Reclasificación
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Cancro bacteriano de tomate	Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	<i>C. michiganensis</i>
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	Podredumbre anular de la papa	Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	<i>C. sepedonicus</i>
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i>	Marchitamiento y tison foliar de Goss del maíz	Maíz (<i>Zea mays</i>)	<i>C. nebraskensis</i>
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>insidiosus</i>	Marchitez bacteriana de alfalfa	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	<i>C. insidiosus</i>
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>tessellarius</i>	Mosaico bacteriano de trigo	Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	<i>C. tessellarius</i>
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>phaseoli</i>	Amarilleamiento foliar bacteriano de poroto	Poroto (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	<i>C. phaseoli</i>
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>capisci</i>	Cancro bacteriano de morrón	Morrón (<i>Capsicum annum</i>)	<i>C. capisci</i>

1.2.2. Características genómicas generales

C. michiganensis pertenece a la clase Actinobacteria, la cual se caracteriza por tener un alto contenido GC en sus genomas (Peritore-Galve et al., 2021). El genoma de referencia de Cm utilizado en este trabajo (NCPPB 382) contiene un cromosoma circular de 3,298 Mb y un contenido GC de 72,6%, además de dos plásmidos circulares: pCM1, de 27,4 kb y 66,5% GC; y pCM2, de 70,0 kp y 67,6% GC (Gartemann et al., 2008). La gran mayoría de los análisis de virulencia y patogenicidad de *C. michiganensis* han sido llevados a cabo estudiando esta cepa y cepas genéticamente relacionadas, pero nuevos estudios de diversidad genética han comenzado a describir cepas que son patogénicas sin el requerimiento del mismo repertorio genético para la generación de síntomas (Tancos et al., 2015; Thapa et al., 2017, 2020). Su diagrama cromosómico circular se encuentra en la Figura 1-5.

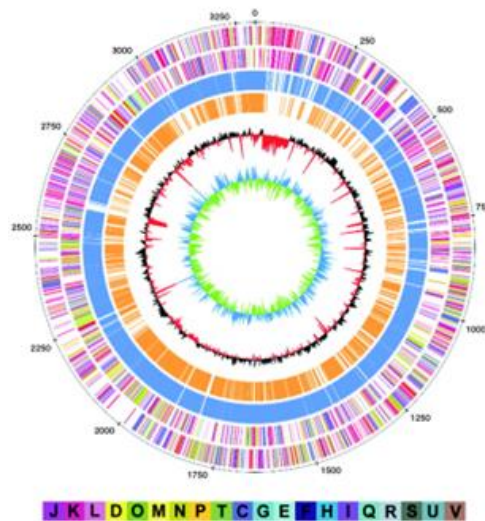


Figura 1-5. Diagrama cromosómico circular de la cepa *Clavibacter michiganensis* NCPPB 382 que muestra características genómicas relevantes. Los círculos proporcionan la siguiente información (del más externo al más interno): círculo 1, posición (kb); círculos 2 y 3, CDS predicho en la cadena *forward* (2) y *reverse* (3), con los colores que indican las clases COG asignadas; círculos 4 y 5, CDS con homólogos en los cromosomas de *C. sepedonicus* (azul) y *L. xyli xili* (naranja); círculo 6, contenido GC junto a las desviaciones del valor medio (72,66%); círculo 7, sesgo GC. La barra inferior muestra los colores de los grupos COG funcionales (C, producción y conversión de energía; D, control del ciclo celular, mitosis y meiosis; E, transporte y metabolismo de aminoácidos; F, transporte y metabolismo de coenzimas; I, biogénesis de membrana y pared celular; N, motilidad celular; O, modificación postraduccion, recambio de proteínas y chaperonas; P, transporte y metabolismo de iones inorgánicos; Q, biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios; R, predicción de función general; S, función desconocida; T, mecanismos de transducción de señales; U, tráfico y secreción intracelular; V, mecanismos de defensa). Adaptado de Gartemann et al., (2008).

Actualmente, se encuentran disponibles en la base de datos de NCBI, 50 genomas de Cm. De éstos, 12 están completos (cepas UF1, MSF322, VL527, VQ28, VQ143, CMM84, CMM09, CMM39, N.P., A5747*, A4758, NCPPB 382), mientras que el resto se encuentran como *scaffolds* o *contigs*.

La cepa tipo LMG7333^T que se encontraba secuenciada previamente (Li & Yuan, 2017), fue recientemente resecuenciada y ensamblada, obteniéndose su genoma completo (Oh et al., 2022), aunque aún no se encuentra disponible en las bases de datos. Se demostró que el genoma completo de esta cepa, como era de esperar, se compone de un cromosoma y dos plásmidos (pCM1 y pCM2). El cromosoma, tiene un tamaño de 3,3 Mb y contenido GC de 72,74%, con 3,118 genes, 3033 CDS, 45 tRNA y 6 rRNA. El plásmido pCM1 tiene un tamaño de 3.27 Mb y contenido GC de 72,74%, con 30 genes, 32 CDS, mientras que pCM2 tiene un tamaño de 0,07 Mb, 66,99% de contenido GC y 70 genes, 67 CDS (Oh et al., 2022). Recientemente, de manera posterior a la realización de los análisis genómicos en el marco de este trabajo, el genoma de referencia de Cm cambió en NCBI, siendo actualmente éste el de la cepa UF1.

1.2.3. Genes involucrados en la virulencia y patogenicidad

Las cepas secuenciadas de *Cm* patógenas contienen el plásmido pCM1 y la mayoría tienen también el plásmido pCM2, el cual está menos conservado tanto en tamaño como en contenido génico; usualmente ambos plásmidos están ausentes en las cepas endófitas, las cuales pertenecen a otras especies de *Clavibacter*, dentro de las cuales algunas afectan a otro tipo de plantas pero han sido aisladas de partes de tomates desinfectadas superficialmente y corroborado su comportamiento endófito en esta planta (Nandi et al., 2018; Thapa et al., 2017).

Para el desarrollo completo de la patogenicidad, la cepa NCPPB 382 requiere los dos plásmidos mencionados (pCM1 y pCM2), mientras que, si carece de alguno de ellos se reduce la misma (Gartemann et al., 2003; Thapa et al., 2017), y si no tiene ninguno no genera marchitamiento. Además, requiere una isla de patogenicidad (IPA) que se encuentra en el cromosoma, llamada *chp/tomA*, de 129 kb, sin la cual se ha visto reduce su colonización y pierde su patogenicidad (Chalupowicz et al., 2017; Gartemann et al., 2008). Esta IPA contiene dos regiones, una llamada *chp* de 79,05 kb y 64.6% de contenido GC, y otra llamada *tomA*, de 49,65 kb y 66.8% de contenido GC.

Una cepa mutante a la cual se le deletó la IPA *chp/tomA*, presentó reducida su capacidad de colonizar respecto a la cepa de referencia, y además no fue capaz de producir síntomas de marchitamiento (Chalupowicz et al., 2010). En los plásmidos y en esta región del cromosoma, se encuentran varios genes que codifican principalmente para proteasas y enzimas degradadoras de pared celular que se postula son importantes en la virulencia del patógeno (Burger et al., 2005; Savidor et al., 2012). Los genes presentes en los plásmidos y la IPA contribuyen aditivamente a la virulencia y colonización (Thapa et al., 2017; Peritore-Galve et al., 2021).

Se ve una influencia variable de los plásmidos en la virulencia y patogenicidad de las cepas de *Cm*, pero predominando la presencia de pCM1 sobre la capacidad de generación de síntomas y colonización de la planta. Sin embargo, se han encontrado cepas virulentas que contienen desde ninguno hasta tres plásmidos diferentes, cuya composición genética no ha sido aún estudiada (Tancos et al., 2015; Thapa et al., 2017, 2020). En otros ensayos, se ha podido observar que cepas que carecen de ambos plásmidos pCM1 y pCM2, logran colonizar las plantas a niveles similares que cepas que sí los contienen, pero son avirulentas, no generan síntomas (Chalupowicz et al., 2017; Nandi et al., 2018; Thapa et al., 2017).

Los únicos genes relacionados con la virulencia encontrados en el plásmido pCM2, son *pat-1* y sus homólogos *phpA* y *phpB* (los tres pertenecientes a la familia de serín-proteasas Chp o Pat-1), los cuales codifican para proteasas de la subfamilia de quimotripsinas S1A. (Burger et al., 2005; Dreier et al., 1997; Gartemann et al.,

2008). Se ha visto la modificación de la patogenicidad en algunas cepas ante la presencia/ausencia de *pat-1*, así como cepas patógenas que carecían de éste (Dreier et al., 1997; Tancos et al., 2015; Thapa et al., 2017).

En el plásmido pCM1, hay un gen de la familia de quimotripsinas S1X, llamado *ppaI*, el cual se encuentra también en el cromosoma (Gartemann et al., 2008). También en este plásmido, se encuentra el gen *celA*, considerado de patogenicidad, que codifica para una proteína compuesta por un dominio celulasa y un dominio expansina (CmEXLX1, cuya función es desconocida) que contiene un péptido señal en su extremo N-terminal (Gartemann et al., 2008; Hwang et al., 2019; Jahr et al., 2000). En una cepa de Cm parcialmente virulenta conteniendo solamente el plásmido pCM1, al eliminar parcial o completamente este gen, se observó la pérdida completa de la virulencia. También se ha observado que al expresar *celA* en cepas no patogénicas, se ve restaurada la capacidad de generar síntomas en las plantas, pero la capacidad de colonización con o sin este gen no se ve modificada (Jahr et al., 2000; Thapa et al., 2017). Sin embargo, se han aislado cepas de plantas de tomate enfermas de cancro bacteriano, que carecían del mismo (Tancos et al., 2015; Thapa et al., 2020).

En la IPA *chp/tomA*, se encuentra el gen *tomA* que codifica para una tomatinasa, la cual deglicosila la α -tomatina presente en la planta y la convierte en tomatidina, con la consecuente pérdida de su capacidad antimicrobiana (Kaup et al., 2005).

En la IPA, hay siete genes miembros de la familia de serín-proteasas Chp o Pat-1 (*chpA-chpG*). Se han detectado transcritos y/o proteínas de *chpC*, E, F y G en plantas con infección sistémica, y de *chpC* durante infección foliar (Burger et al., 2005; Chalupowicz et al., 2017; Nandi et al., 2018). Al mutar *chpC*, E, F y G, se vio una reducción en la severidad de lesiones foliares durante una infección foliar (Chalupowicz et al., 2017). Al mutar *chpC* se genera, además, una reducción de la concentración bacteriana in planta y disminución de síntomas generados (Stork et al., 2008). Se cree que *chpA*, B y D son pseudogenes ya que tienen corrimientos del marco de lectura y/o codones stop dentro del marco de lectura (Stork et al., 2008), aunque *chpA* produce transcritos (Flügel et al., 2012).

Tanto fuera como dentro de la isla de patogenicidad *chp/tomA* en la cepa NCPPB 382, se pueden encontrar CAZimas con actividad pectinasa (gen *pgaA* en cromosoma fuera de la IPA, *peIA1* y 2 en zona *chp* de IPA); solamente fuera de la IPA se encuentran genes que codifican CAZimas con actividad xilanasa (*xysA* y *B*) y actividad endoglucanasa (*endX/Y*) (Gartemann et al., 2008; Peritore-Galve et al., 2021; Thapa et al., 2017). Para el caso de las enzimas con actividad pectinasa, al mutar el gen *pgaA* que codifica para una poligalacturonasa, se observó una reducción en la formación de lesiones foliares tipo “blíster”, no así en la generación de marchitez. Por otro lado, al mutar *peIA1* o *peIA2*, los cuales codifican para pectato-liasas, se reduce la virulencia, pero sin afectarse la capacidad de colonización (Chalupowicz et al., 2017; Thapa et al.,

2017). Se demostró que la endoglucanasa codificada por el gen *endX/Y*, tiene rol en la formación de lesiones foliares tipo “blíster” pero no en el marchitamiento (Chalupowicz et al., 2017).

Hay varios genes que se encuentran tanto dentro como fuera de la PAI, genes que codifican para subtilasas: *sbtA* en zona *chp* de IPA, *sbtB* y *sbtC* en cromosoma fuera de ella (Peritore-Galve et al., 2021). Solo al mutar *sbtA*, se vio una reducción de las lesiones “blíster” y marchitamiento generado en las plantas, lo cual no ocurre al mutar *sbtB* y *C* (Chalupowicz et al., 2017).

Hay genes de la familia de quimiortipsinas S1X, tanto en la IPA como en el cromosoma: en el cromosoma se encuentran *ppaF-I*, mientras que en la zona *chp* de la IPA, se encuentran *ppaA-E* (Gartemann et al., 2008). Se observó que al caracterizar funcionalmente a mutantes de *ppaA* y *ppaC* en el genoma NCPPB 382, que estos no contribuyeron al desarrollo de marchitamiento o síntomas foliares (Chalupowicz et al., 2017; Peritore-Galve et al., 2021).

En el cromosoma, fuera de la IPA *chp/tomA*, también se encuentran (*ppa*: una celulasa de unión a carbohidratos *celB*, y una expansina *expA* (CmEXLX2). Se supone que *celB*, el cual carece de una señal de secreción, es un pseudogen pues tiene un dominio C-terminal trunco (Stork et al., 2008). Ha sido observado que esta proteína no tiene actividad celulasa y aún al ser modificada para ser secretada, no fue capaz de restaurar la virulencia en una cepa mutante para *celA* (Hwang et al., 2019). De hecho, al quitar este gen en la cepa NCPPB 382, no se ve un efecto significativo en el desarrollo de marchitamiento y lesiones (Chalupowicz et al., 2017). El gen que codifica para la expansina *expA* (CmEXLX2), al ser mutado en una cepa que carece del *celA*, generó tres veces más marchitamiento, junto a una mayor severidad de lesiones “bird’s-eye” en los frutos (Tancos et al., 2018). La función de CmEXLX2 sigue siendo desconocida, pero por estudios hechos a expansinas de otras bacterias junto al fenotipo hipervirulento observado al mutar CmEXLX2, se sugiere que esta podría retrasar la respuesta inmune de las plantas al unirse competitivamente a la celulosa y hemicelulosa en el xilema, generando una menor actividad enzimática de hidrólisis por parte de las CAZimas (enzimas activas sobre carbohidratos), y disminuyendo los DAMPs (*damage associated molecular patterns* o patrones moleculares asociados a daño) que activan el sistema inmune (Choi & Klessig, 2016; Peritore-Galve et al., 2020; Tancos et al., 2018). También fuera de la IPA, dentro del cromosoma,

se encuentran los genes perforina (*PerF*), y sortasa (*SrtA*), las cuales no se ha visto que sean necesarias para que haya generación de marchitamiento, pero sí lo son para la formación de lesiones foliares “blíster” (Chalupowicz et al., 2017; Hendrickx et al., 2011).

Al analizar el genoma de la cepa NCPPB 382, se identificó el cluster de genes *wcm*, ubicado en el cromosoma, como el responsable de la mayor parte de la producción de exopolisacáridos de Cm y al mutar los genes del

mismo, se vio que la reducción de EPS secretados no afecta la virulencia ni la colonización (Gartemann et al., 2008).

En la [Tabla 8-1 \(apéndice\)](#), se resume la evidencia actual sobre los principales genes de virulencia.

1.3. Interacción planta – patógeno

1.3.1. Mecanismos de colonización de *C. michiganensis*

Las bacterias patógenas que colonizan el xilema suelen hacerlo gracias a capacidades relacionadas a la quimiotaxis y sistemas de motilidad, pero no es el caso de Cm, dado que no presenta quimiotaxis, pili, o genes que codifiquen para adhesinas (Bermpohl et al., 1996; Gartemann et al., 2008; Peritore-Galve et al., 2021). La producción de exopolisacáridos no es esencial para la colonización y virulencia de Cm durante la colonización del sistema vascular de las plantas ya que se ha visto que al mutar el cluster *wcm* (identificado como el principal en la producción de exopolisacáridos) no se afectan las mismas (Gartemann et al., 2008). Se observó que esta bacteria, a diferencia de cuando crece en un medio nutriente o mínimo, al cultivarse en savia del xilema o un medio que contiene la misma, forma agregados por la producción de compuestos *biofilm-like* (Chalupowicz et al., 2012; Peritore-Galve et al., 2020; Tancos et al., 2018).

Se han identificado genes en la cepa referencia NCPPB 382 similares a adhesina (*adhesin-like*), y además dos operones de genes que codifican para los pili Tad, los cuales se conoce pueden extenderse y retraerse, y están asociados con el detección de superficie, formación de *biofilm* y agregación bacteriana, pero se vio que la mayoría no se expresan cuando la bacteria se cultiva en caldo lisogénico (LB), sugiriendo que contribuyen al agregado de la bacteria en presencia de savia xilemática (Ellison et al., 2019; Peritore-Galve et al., 2019; Sangermani et al., 2019; Tomich et al., 2007).

Se ha observado también, que tanto la cepa NCPPB 382 como otras cepas relacionadas no patogénicas que carecen de la IPA y/o plásmidos, pueden colonizar en un sentido contrario al del flujo de la savia xilemática, por lo que gracias a esta observación junto a las evidencias anteriormente nombradas, se sugiere que *C. michiganensis* podría tener motilidad activa, cuyos genes asociados se encuentran fuera de la IPA en el cromosoma (Chalupowicz et al., 2012; Peritore-Galve et al., 2021; Windt et al., 2006).

La razón por la cual los síntomas característicos del cancro bacteriano se hacen presentes se desconoce aún. En cambio, sí se conoce el proceso de colonización que lleva a cabo Cm: inicialmente coloniza el protoxilema, y a medida que avanza la enfermedad, va colonizando el metaxilema y las células parenquimáticas (Chalupowicz et al., 2012; Peritore-Galve et al., 2020; Rapicavoli et al., 2018; Tancos et al., 2018). Estudios han demostraron que las cepas no patogénicas pueden reproducirse y colonizar el

sistema vascular tal como las cepas que sí lo son, pero no pueden generar marchitez; por ende, se deduce que la marchitez no depende solamente del bloqueo de los haces vasculares (Wang et al., 2022).

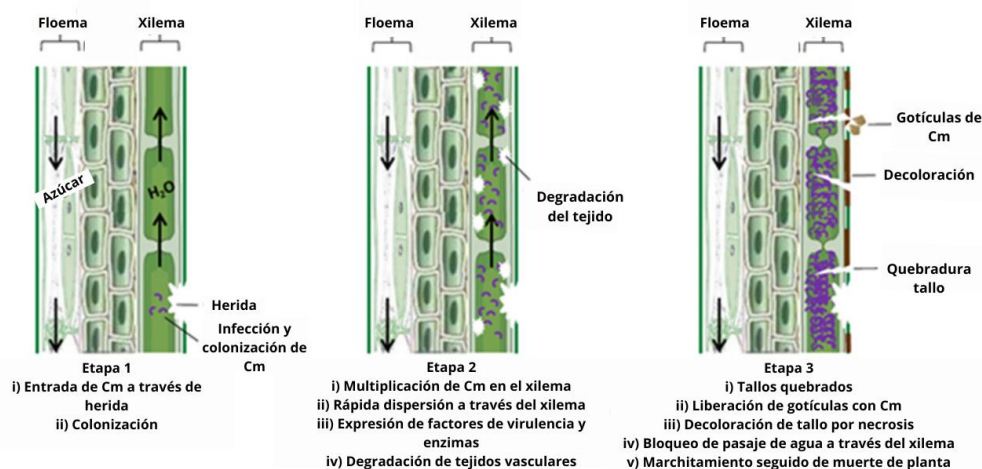


Figura 1-6. Etapas del progreso de la enfermedad del cancro bacteriano en el tallo de la planta. Adaptado de Nandi et al., 2018.

1.3.2. Mecanismos de defensa de la planta de tomate frente a *C. michiganensis*.

En respuesta al ingreso de *C. michiganensis*, la defensa basal de la planta se ve activa a partir de los 8 - 12 días post inoculación (dpi), lo que implica un aumento de la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis, producción de especies reactivas derivadas de oxígeno y una mayor producción de etileno (Balaji et al., 2008; Chalupowicz et al., 2012; Coaker & Francis, 2004; Nandi et al., 2018; Savidor et al., 2012). Un breve resumen y esquematización de este proceso puede verse en la Figura 1-7. Estas respuestas desencadenan además cascadas de señales de traducción, mediante fosfatasa y quinasas (Balaji et al., 2008; Beckers et al., 2009; Mayrose et al., 2004). Otras proteínas que se ven normalmente aumentadas cuando se da una infección ya sea por virus, bacterias u hongos son las peroxidasas de clase III, relacionadas con la reparación de lesiones y defensa (Harrison, 1995; Hiraga et al., 2001; Reimers et al., 1992; Savidor et al., 2012; van Loon et al., 2006). Además, también hay proteínas que, en vez de aumentar su síntesis, se ven inhibidas en los tejidos vasculares de la planta. Por otro lado, la producción de etileno juega un rol central en el desarrollo de marchitamiento, ya que se ha asociado con la inducción de síntesis de tilos y pectinas por parte de la defensa vascular, como forma de impedir que el patógeno se disemine, pero también impidiendo el pasaje de agua a través del sistema vascular (Pérez-Donoso et al., 2007; Peritore-Galve et al., 2021; VanderMolen et al., 1983).

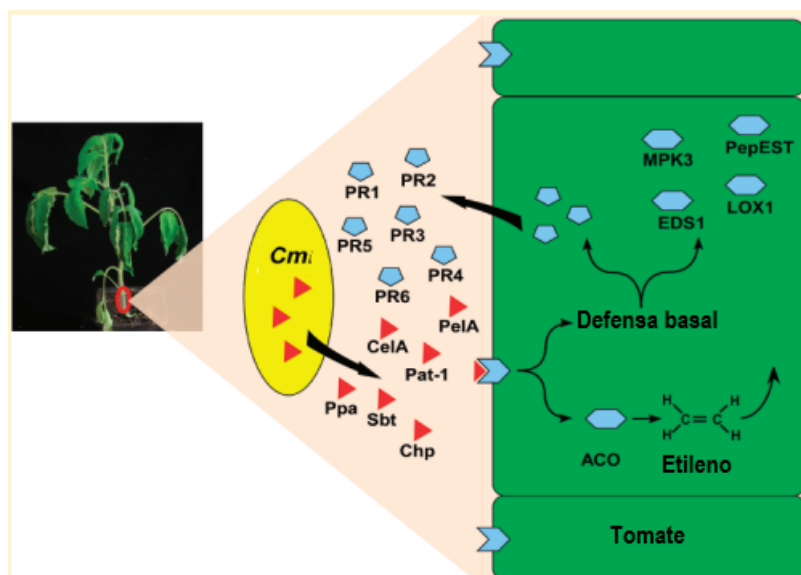


Figura 1-7. Diagrama ilustrando la respuesta generada tras la infección de *Clavibacter michiganensis*. En celeste: algunas de las proteínas expresadas por la planta de tomate al ser infectada. En rojo: algunas de las proteínas expresadas por Cm tras ingresar a la planta. Adaptado de Savidor, A. et al., 2012.

1.4. Análisis genómicos, pan-genómicos y tecnologías next generation sequencing (NGS).

Para el estudio genómico microbiano, la mejor aproximación para describir una especie es utilizar el concepto de pangenoma, el cual está formado por la combinación del genoma “core” o núcleo, que contiene genes presentes en todas las cepas, junto al genoma “prescindible”, “adaptativo” o “accesorio”, el cual contiene genes presentes en varias cepas (pero no en todas), además de genes cepa-específicos, encontrados solamente en una cepa. Se considera pangenoma al repertorio genético entero de un clado filogenético, siendo la resolución filogenética del clado de interés ilimitada, pudiendo ir desde especie hasta filo o más (Tettelin & Medini, 2020; Vernikos et al., 2015). Para la gran mayoría de especies de patógenos humanos y bacterias ambientales, se muestra un pangenoma abierto, lo que indica que se necesita estudiar un número grande e indeterminado de genomas para identificar todos los genes de las mismas y así obtener un pangenoma cerrado, donde incluso al secuenciar nuevos genomas, no se obtienen genes nuevos que expandan el mismo (Vernikos et al., 2015).

Para toda esta clase de estudios, han sido de utilidad las tecnologías de secuenciación de última generación, o mayormente conocidas como “Next Generation Sequence technologies” (NGS technologies). Dentro de esta tecnología se encuentra una amplia variedad de métodos, dos de los cuales fueron utilizados para este trabajo; tecnología *Illumina* y *Nanopore*.

La tecnología *Illumina*, forma parte de los métodos de secuenciación de segunda generación: se le llama “segunda” generación, porque incluye métodos que sucedieron a la secuenciación basada en el método

de Sanger, que fue una de las primeras plataformas desarrolladas, o sea, de primera generación. Esta generación, surge por la necesidad de secuenciar genomas grandes con un alto rendimiento y a bajos costos (Slatko et al., 2018). Dentro de todas las tecnologías de secuenciación de segunda generación, se encuentran aquellas que secuencian por hibridación y por síntesis (SBS, *sequencing by synthesis*), como es el caso de *Illumina* (Slatko et al., 2018). Estos métodos, suelen comenzar con la preparación de la librería mediante la fragmentación del ADN, reparación de sus extremos seguido de ligación de adaptadores, luego fijación a una superficie y amplificación *in situ*, para luego secuenciar y obtener lecturas cortas (hasta 300 pb) por reacciones de secuenciación individuales en paralelo. En el método *Illumina*, previo a la secuenciación, se realiza una amplificación clonal (generación de *clusters*) de las librerías de ADN dentro de la celda de secuenciación. La secuenciación se basa en la incorporación, utilizando una DNA polimerasa, de nucleótidos fluorescentes unidos a un terminador reversible, los cuales se incorporan de a un tipo por ciclo, unión tras la cual se cliva el fluoróforo junto al terminador y se analiza ópticamente la señal fluorescente emitida (Hu et al., 2021). *Illumina* permite realizar lecturas pareadas, obtenidas tras leer desde ambos extremos de cada fragmento de ADN (se genera una lectura *forward* o directa y *reverse* o reversa, llamándose “par” al conjunto de lecturas en ambos sentidos) mejorándose así la cobertura y calidad de la secuenciación. La preparación de librerías y posterior secuenciación se esquematiza en la Figura 1-8.

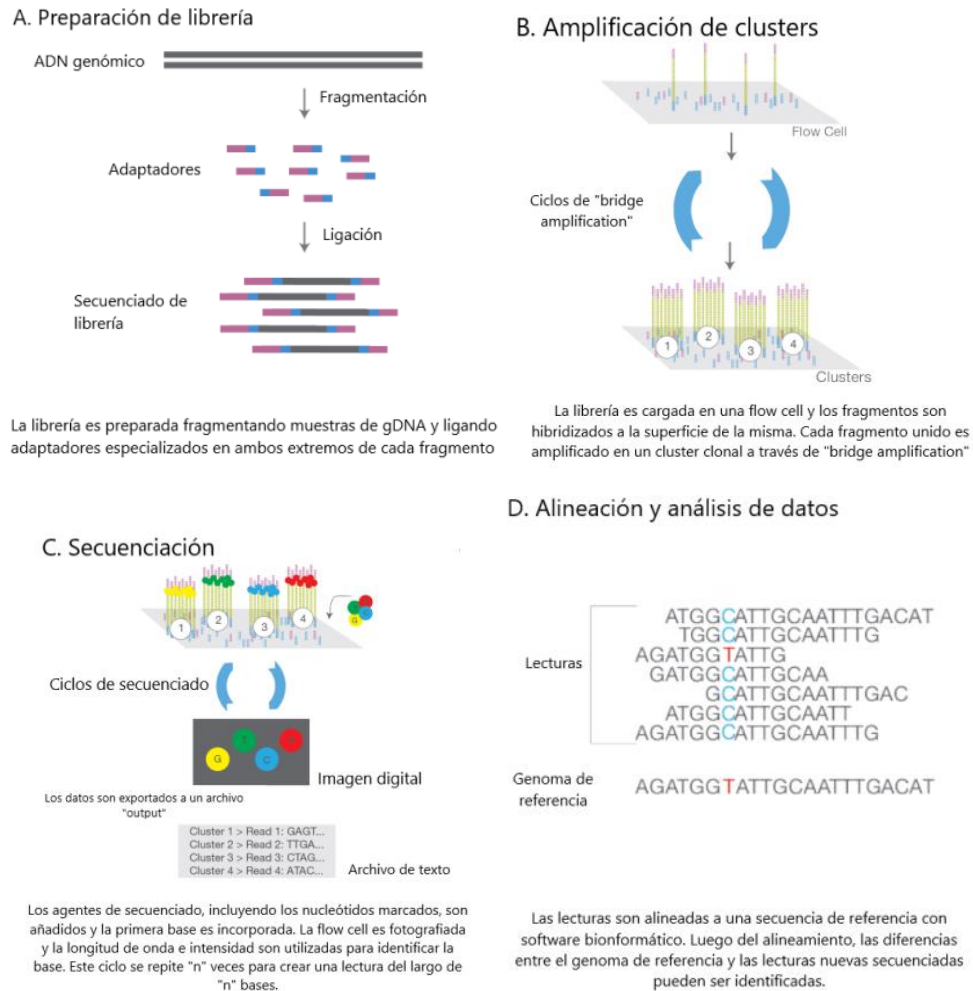


Figura 1-8. (A-D) Pasos realizados en la secuenciación por *Illumina*. Adaptado de: Illumina, (2018).

La secuenciación por tecnología *Oxford Nanopore* (ONT) (Figura 1-9), pertenece a un conjunto de métodos que conforman la tecnología de secuenciación de tercera generación, o de lecturas largas, pudiendo ser para *Nanopore*, mayores de 1 Mb. Este tipo de secuenciación funciona gracias a la presencia de nanoporos proteicos por los cuales pasa una molécula simple hebra de ADN o ARN y la detección se genera por cambios de la corriente iónica cuando los nucleótidos van pasando a través del poro. Para facilitar las lecturas en el poro, se liga un adaptador que contiene una enzima motora, la cual se une al poro guiando las moléculas a detectar hacia este y además genera la simple hebra (Clarke et al., 2009; Hu et al., 2021). El tipo de lecturas generadas por ONT, así como de PacBio que es otro método perteneciente a la tecnología de tercera generación, tienen mayores tasas de error que las lecturas cortas generadas por las de segunda generación, por lo que suelen utilizarse ambas, y complementarse sus lecturas, para los posteriores análisis bioinformáticos.

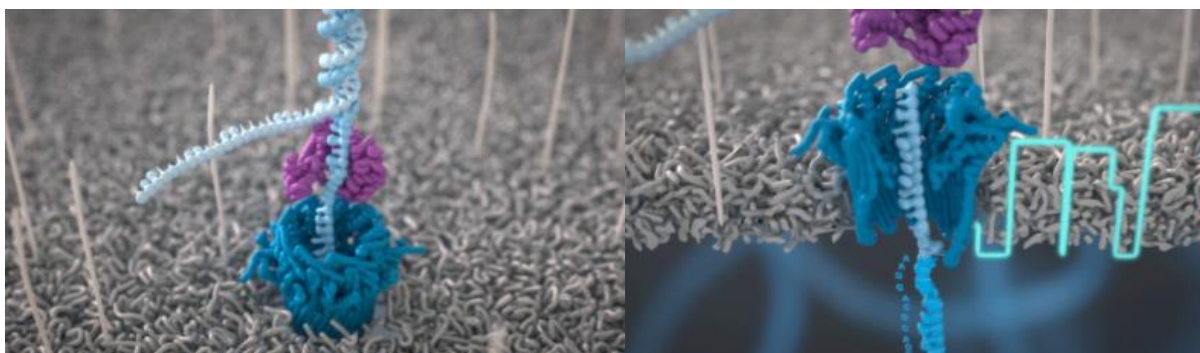


Figura 1-9. Pasaje de la hebra de ADN por el nanoporo, con su consecuente lectura por medio de cambios de voltaje. Fuente: *Nanopore* (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK).

1.5. Antecedentes en Uruguay

1.5.1. Producción de tomate en Uruguay

En Uruguay, el cultivo de tomate ocupa el segundo puesto en volumen de producción y valor bruto de producción (INIA, 2017). Las semillas utilizadas para la producción en campos uruguayos se importan desde múltiples países, como Estados Unidos., Francia, Tailandia, Italia y China. Cm no es considerado un patógeno cuarentenario en Uruguay, por lo que no se les realiza ningún control a las semillas que ingresan al país (Croce, 2016). Una plaga cuarentenaria es, según ISPM 5, FAO, “plaga de importancia económica potencial para el área amenazada y aún no presente allí o presente pero no ampliamente distribuido y siendo controlado de manera oficial” (traducido de ISPM 5, FAO). Sin embargo, en Uruguay existen las “Normas de Producción Integrada para el Tomate Bajo Invernáculo – Zona Sur” elaboradas por la Facultad de Agronomía, el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) y la Dirección General de la Granja (DIGEGRA), en las cuáles se sugieren buenas prácticas para una producción óptima del cultivo.

En la zafra 2014-2015, en los cultivos a campo de la zona Sur se obtuvo una producción de 3818 toneladas de tomate de mesa y 2938 toneladas de tomate perita, obteniéndose, para la misma zona, pero en cultivos protegidos, 8537 toneladas. En la zona Norte, no hay cultivo de tomate a campo, pero si protegidos, donde se cosecharon 19942 toneladas de tomate y 282 toneladas de tomate Cherry (MGAP - DIEA, 2020).

Se puede observar gráficamente (Figura 1-10), que la mayor cosecha de tomate de mesa se da en la zona Norte, donde la modalidad productiva es el cultivo protegido.

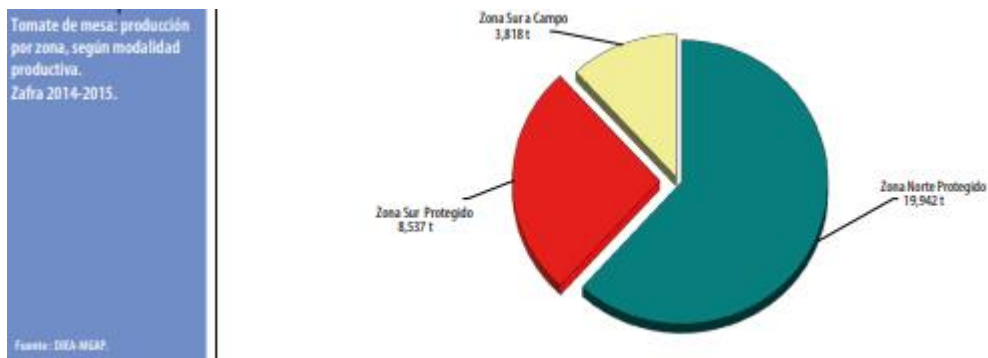


Figura 1-10. Cantidad de tomate de mesa producido según zona y modalidad de producción. Fuente: MGAP-DIEA, 2020.

1.5.2. Estudios previos sobre el cancro bacteriano en Uruguay

En Uruguay, se han estudiado métodos de control de Cm, entre ellos la utilización de rotaciones del cultivar con maíz dulce a modo de disminuir la incidencia, también el uso de soluciones desinfectantes aplicadas por goteo a modo de prevención, métodos de desinfección de las semillas de tomate y aplicación de productos al follaje o al riego (Maeso, 2020).

Desde el año 2011, este patógeno es estudiado por nuestro grupo de investigación, el cual está conformado por investigadores de Facultad de Química, Facultad de Agronomía e INIA. Se han desarrollado métodos moleculares de diagnóstico de Cm en diferentes tipos de muestras que pueden diseminar este patógeno (plantas asintomáticas, semillas), optimizándose en particular un método que se basa en una BIO-multiplex qPCR, capaz de detectar una semilla infectada en un lote de dos mil semillas, siendo un método muy sensible y específico (Croce, 2016). Por otro lado, se realizaron relevamientos en diferentes zafas y zonas de producción y se generó una colección de 54 cepas de Cm representativa de la diversidad existente en el país. Esta colección fue evaluada a nivel genético para estudiar su diversidad. Para ello, se utilizó el esquema reportado por Jacques et al. (2012) para la técnica *Multilocus Sequence Analysis and Typing* (MLSA-MLST), donde se obtienen, tras la concatenación de las amplificaciones obtenidas a partir de varios genes *housekeeping* o de mantenimiento, se determinan diferentes secuenciotipos (STs) en base a los números alélicos asignados para cada secuencia única (Croce et al., 2016). Los genes utilizados fueron: *atpD*, *gyrB*, *dnaK*, *ppK* y *recA*, comparándose los mismos entre cepas uruguayas y con otras cepas de distintas partes del mundo (Croce et al., 2016). Así fue como se agruparon los 54 aislamientos en 12 secuenciotipos (STs), los cuales pueden observarse en el árbol filogenético realizado al concatenar los genes utilizados para el análisis (Figura 1-11) (Croce, 2016).

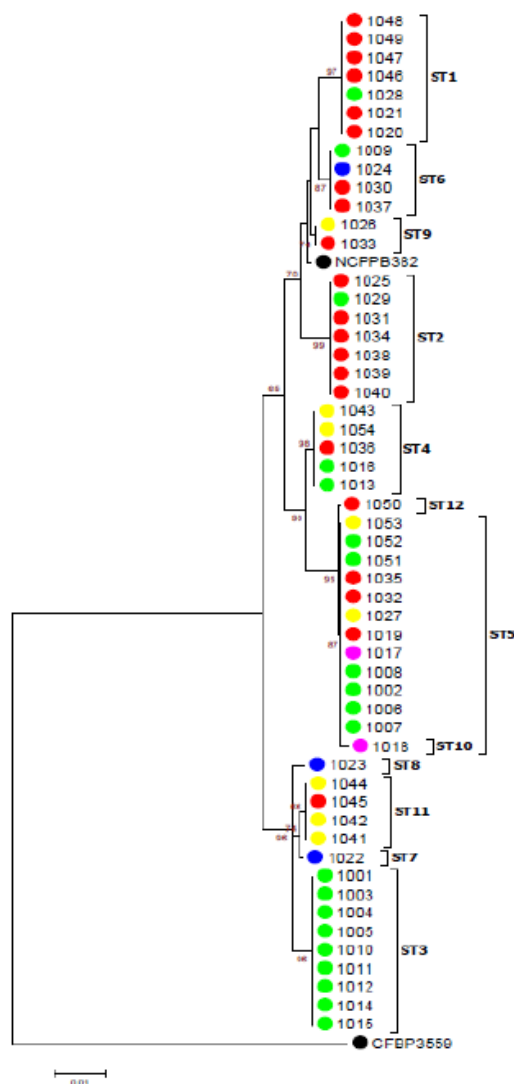


Figura 1-11. Árbol filogenético representando todas las cepas de *Clavibacter michiganensis* aisladas en Uruguay. Obtenido al concatenar las secuencias parciales de los genes *housekeeping* utilizados en el análisis de MLSA-MLST. Cada nodo muestra los valores de *bootstrap* > 50% y se ven los *clusters* correspondientes a los STs con los cuales fue identificado. Los colores representan departamentos de Uruguay donde fueron obtenidos los aislamientos: Salto (verde), Artigas (azul), Montevideo (rojo) Canelones (amarillo) y San José (fucsia), el color negro corresponde a las cepas de referencia. Fuente: Croce, 2016.

Se pudo observar que no hay una relación entre los STs y su origen ni momento de aislamiento, y la alta diversidad genética en las cepas presentes en Uruguay. Los 12 STs identificados, fueron posteriormente caracterizados con el fin de identificar diferencias fenotípicas a nivel de virulencia. Para ello, se inocularon plantas de tomate con cepas representativas de cada ST mediante el método de punción en tallo (Ramponi, 2018). Para evaluar la agresividad que las cepas elegidas se realizó un seguimiento de los

síntomas generados sobre plantas de tomate. Uno de los resultados más llamativos obtenidos de este estudio, fue la cepa perteneciente al ST 3 (MAI 1001) no produjo síntomas en ninguna planta de tomate inoculada y por eso no se presenta en el gráfico (Figura 1-12). Por otro lado, se observaron diferencias significativas de agresividad entre las otras cepas de Cm analizadas (Figura 1-12). La cepa correspondiente al ST 12 (MAI 1050) presentó mayor agresividad que las cepas de los ST 2 (MAI 1032), ST 9 (MAI 1026) y ST 11 (MAI 1044), mientras que las otras cepas mostraron una agresividad intermedia (Ramponi, 2018).

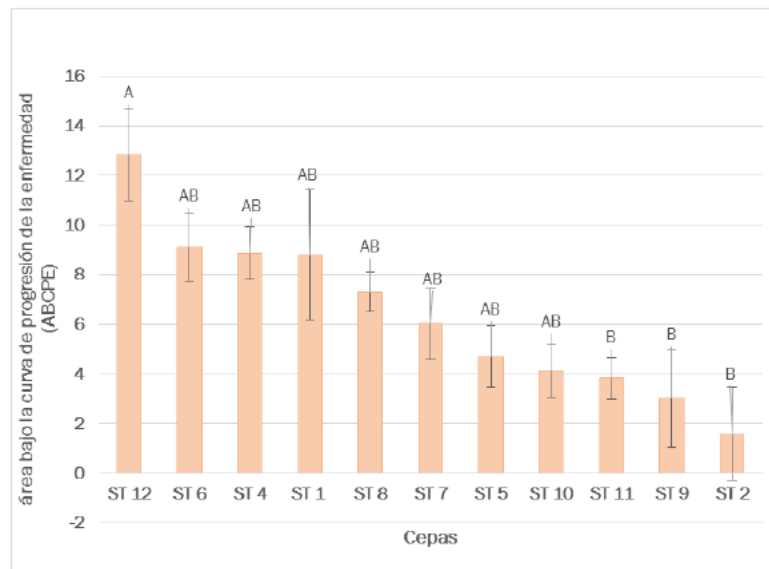


Figura 1-12. Resultados del análisis de agresividad de las cepas de *Clavibacter michiganensis* representativas de 11 STs identificados en Uruguay. Las barras naranjas representan el área bajo la curva del avance de los síntomas y las barras negras representan el error estándar asociado a las mismas. Las letras sobre las barras representan los grupos con agresividad significativamente diferentes en base al índice de Tukey (p -valor<0,05). Fuente: Ramponi, (2018).

Para el estudio del potencial patogénico de las cepas, también se evaluó la capacidad de multiplicación del patógeno *in planta* mediante recuento en microgota y qPCR. Los resultados mostraron que la cepa MAI 1001 (ST 3), no generó síntomas, pero se logró multiplicar activamente en las plantas inoculadas (Ramponi, 2018). Estos resultados preliminares destacan la importancia de continuar profundizando en el análisis comparativo de estas cepas y determinar si existe una base genética que explique estas diferencias de agresividad.

2. HIPÓTESIS

La cepa de Cm MAI 1001 no genera síntomas de cancro bacteriano, pero si logra multiplicarse dentro de las plantas de tomate. Esto puede deberse a que carece de genes asociados a la virulencia.

3. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

3.1. *Objetivo general*

Realizar un análisis comparativo para evaluar la diferencia en la virulencia de cepas de *Clavibacter michiganensis* (Cm) pertenecientes a diferentes STs y asociarlo al análisis genómico de las mismas para evaluar si existe una diferencia en los genomas de las cepas virulentas, así como de éstas respecto a la cepa MAI 1001 de virulencia reducida.

3.2. *Objetivos específicos*

1. Evaluar diferentes métodos de inoculación de Cm para el seguimiento de la enfermedad en plantas de tomate.
2. Comparar la virulencia y capacidad de infección de cepas de Cm de distintos STs.
3. Secuenciar el genoma completo de cepas de Cm con niveles intermedios a altos de virulencia y la cepa MAI 1001 con baja virulencia y estudiar las bases genéticas que podrían explicar estos fenotipos.

3.3. *Estrategia de trabajo*

Para el análisis de patogenicidad, se utilizaron cuatro cepas de Cm cuya virulencia ha sido previamente estudiada y reportada (Ramponi, 2018): MAI 1001, MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050. Al haberse evaluado la patogenicidad de estas una sola vez por Ramponi (2018), se consideraba necesario confirmarlo. Adicionalmente, para el análisis genómico, se añadió una cepa más (MAI 1018) cuya virulencia ha sido también previamente reportada (Ramponi, 2018), pero no estudiada en este trabajo. Estas cepas fueron aisladas de distintas regiones del país a partir de plantas de tomate con síntomas de cancro bacteriano. Las mismas pertenecen a diferentes STs previamente determinados por el método MLSA – MLST (Croce, 2016). Fueron seleccionadas en base a los niveles de virulencia, buscando tener dentro del análisis las cepas con diferencias de agresividad, que además pertenezcan a diferentes STs y presenten diferentes orígenes de aislamiento. Dentro de las cuatro cepas cuya virulencia fue estudiada en este trabajo, se encuentra una cepa avirulenta (MAI 1001 perteneciente al ST 3) aislada en un campo de Salto, dos cepas con virulencia alta/intermedia (MAI 1009 del ST 6, MAI 1023 del ST 8 y MAI 1050 del ST 12), las cuales

fueron aisladas en Salto, Artigas y Montevideo respectivamente. La cepa añadida para el análisis genómico fue aislada de un campo de San José, y es la única perteneciente al ST 10. En el trabajo realizado por Ramponi (2018) presentó una virulencia intermedia.

Se evaluaron tres métodos de inoculación de Cm en plantas de tomate para confirmar y evaluar en mayor profundidad las diferencias de agresividad encontradas en trabajos previos del grupo. Los métodos elegidos fueron: inoculación por punción en tallo, por corte con tijeras y por asperjado de raíces. Estos métodos permiten a la bacteria ingresar al sistema vascular de la planta por formas diferentes: en el método por punción en tallo, la bacteria ingresa mediante una pequeña lesión, de forma directa sobre el sistema vascular; en el método por corte con tijeras, la bacteria queda sobre el corte realizado pudiendo ingresar allí al sistema vascular; finalmente por el método de asperjado de raíces, la bacteria ingresa mediante las lesiones que se generan sobre las raíces al quitar la planta de la almaciguera. Al observar diferentes formas de ingreso de Cm a la planta de tomate, se busca reproducir algunas formas de infección que pueden darse en los cultivos de producción, y poder evaluar si hay una diferencia en la capacidad de reproducción de Cm en la planta y en el avance de la enfermedad. Para estudiar el avance de la enfermedad se registró periódicamente la marchitez foliar en las plantas inoculadas por cada método. La capacidad de colonizar y reproducirse de las cepas se estudió mediante un recuento en microgota.

Para analizar con mayor profundidad estas cepas y evaluar si existe una base genética que explique las diferencias de virulencia observadas, se secuenciaron y ensamblaron sus genomas. La secuenciación se realizó utilizando dos plataformas complementarias (*Illumina* y *MinION Nanopore*) con el objetivo de obtener ensamblajes de buena calidad mediante combinación de los diferentes tipos de lecturas obtenidas. Esto se debe a que la secuenciación mediante *Nanopore* permite obtener lecturas de grandes fragmentos de ADN optimizando el posterior ensamblaje, mientras que las lecturas cortas obtenidas por la secuenciación *Illumina*, minimizan los errores en el posterior ensamblaje debido a que tienen un menor porcentaje de error. De esta manera, al realizar el ensamblaje híbrido, podemos aprovechar los beneficios de ambos tipos de plataformas. Posteriormente se utilizaron herramientas informáticas para realizar comparaciones a nivel genómico: se analizó la calidad de reads y ensamblajes obtenidos, los cuales fueron posteriormente anotados y analizados a modo de obtener un análisis comparativo entre los mismos, además de corroborar la asignación taxonómica de las cepas. En el análisis comparativo, se buscó principalmente identificar las diferencias a nivel de genes asociados a la virulencia y genes diferenciales, los cuales podrían explicar la diferencia de virulencia observada en los ensayos de inoculación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Cepas y condiciones de cultivo

Para el análisis de patogenicidad se utilizaron cuatro cepas de Cm seleccionadas a partir de trabajos previos del grupo (Croce, 2016; Ramponi, 2018). Para el análisis genómico, se añadió una cepa de Cm (MAI 1018). El origen y características de estas cepas se presentan en la Tabla 4-1.

Tabla 4-1. Origen de aislamiento, tipificación y nivel de virulencia de las cepas de *Clavibacter michiganensis* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Origen	Año	Variante alélica (ST) ¹	Nivel de virulencia ²
MAI 1001	Salto	2012	ST 3	Avirulenta
MAI 1009	Salto	2012	ST 6	Intermedia
MAI 1023	Artigas	1997	ST 8	Intermedia
MAI 1050	Montevideo	2014	ST 12	Alta
MAI 1018	San José	2012	ST 10	Intermedia

¹ ST: secuenciotipo determinado mediante análisis MLST (Croce et al., 2016)

² Nivel de virulencia determinado en Ramponi (2018)

Las cepas se conservan en glicerol 15% estéril a -70°C (Schaad et al., 2001) y fueron descongeladas previo a la realización de cada ensayo. Se aislaron por estrías en medio agar nutriente – extracto de levadura (NBY) y las placas fueron incubadas a 28°C durante 72 horas. Las colonias aisladas fueron subcultivadas en tubos con medio NBY líquido, los cuales fueron incubados a 28°C, con agitación de 150 rpm, durante 48 horas. Se partió de los cultivos líquidos tanto para la generación de inóculos del ensayo de seguimiento de la enfermedad, como para la extracción de ADN utilizado para el análisis genómico.

Para aislar Cm de las plantas infectadas, se utilizó un medio de cultivo semi – selectivo para Cm (SCM) (Schaad et al., 2001). El detalle de composición y protocolo de preparación se encuentra en el Apéndice 8.1.

4.2. Inoculación de plantas de tomate

Se realizaron dos ensayos de patogenicidad. En el primero, se utilizaron plantas provenientes de semillas de tomate de variedades Elpida, Genoves y Santa Cruz. En el segundo se utilizaron únicamente plantas de la variedad Elpida. Las semillas fueron sembradas en almacigueras en cámara de crecimiento a 24°C, 80% de humedad aproximadamente y un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Las plántulas fueron trasplantadas a macetas individuales tras aproximadamente 30 días de crecimiento, donde fueron inoculadas. El inóculo se realizó a partir de cultivo líquido de cada cepa en NBY incubado durante 48 horas. Se centrifugó el cultivo 10 minutos a 8000 rpm y el pellet se resuspendió en agua estéril. Se ajustó la

suspensión bacteriana a una concentración de 10^8 células/mL por medida de turbidez en espectrofotómetro (0,14 – 0,18 de densidad óptica a 600 nm).

La inoculación fue realizada por tres métodos: punción en tallo, corte con tijeras y asperjado de raíces (Figura 4-1). La inoculación por punción se realizó en el pecíolo de la primera hoja verdadera, se colocaron allí 5 μ L del inóculo y posteriormente se realizó una herida con aguja estéril. Para la inoculación por tijera, se cortó completamente el tallo por encima de la primera hoja verdadera, utilizando una tijera previamente sumergida en inóculo bacteriano. En el caso del inóculo por asperjado, se asperjaron las raíces de las plántulas en almaciguera con cuatro disparos (aproximadamente 4 mL) de inóculo y luego se trasplantaron a las macetas.



Figura 4-1. Infección de plantas de tomate con cepas de *Clavibacter michiganensis* mediante diferentes métodos de inoculación. A y B: Método de punción en tallo. C: Método de corte con tijeras: D: Método de asperjado de raíces.

Los métodos de inoculación utilizados intentan reproducir diferentes vías de infección natural que caracterizan a este patógeno. Por ejemplo, el método de “tijeras” se aproxima a las infecciones secundarias observadas en cultivos protegidos asociadas principalmente a prácticas de manejo que promueven la transmisión del patógeno entre plantas de un mismo invernáculo (podas, etc). En el método

de “asperjado” se evalúa la capacidad de infectar la planta a través de las raíces, lo que implica la capacidad del patógeno de colonizar diferentes tejidos a medida que progresa la infección. Por último, el método de “punción en tallo”, facilita la inoculación directa de Cm a nivel del xilema, que constituye el sitio final de multiplicación de este patógeno. Estos métodos ya han sido utilizados en trabajos previos en el patosistema Cm-tomate (Thapa et al., 2017; Méndez et al., 2020; Peritore-Galve, Miller & Smart, 2020; Oh et al., 2022).

4.3. Evaluación de la virulencia de las cepas de *C. michiganensis*

Se evaluó la virulencia de las cepas MAI 1001, MAI 1009, MAI 1023 Y MAI 1050 en plantas de tomate, utilizando los métodos de inoculación descritos anteriormente. Se utilizó un arreglo factorial con un diseño experimental completamente al azar, que incluyó 10 réplicas biológicas por cada combinación de cepa y método de inoculación. Además, se incluyeron 10 plantas inoculadas con agua estéril para cada método como control negativo. Esta evaluación se realizó en dos ensayos independientes repetidos bajo las mismas condiciones experimentales.

En cada ensayo se realizó un seguimiento de las plantas inoculadas durante 27 días registrando los síntomas marchitamiento foliar según una escala de 0 a 4 (siendo 0: planta asintomática y 4: planta muerta). Se graficó el índice de marchitamiento promedio en función del tiempo para cada tratamiento y se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC) como variable de respuesta para el análisis estadístico según se detalla más adelante.

4.4. Determinación de infecciones latentes por recuento en microgota

Se utilizó el método de recuento en microgota para detectar y cuantificar la concentración de Cm en las plantas inoculadas con la cepa MAI 1001 que permanecieron asintomáticas tras 27 días de la inoculación. Para ello, se tomó un fragmento de tallo de aproximadamente 1 cm de cada planta. Para las plantas inoculadas por el método de punción en tallo, se tomó un fragmento sobre el sitio de inoculación; para las plantas inoculadas por el método de tijeras, el fragmento tomado fue por debajo del corte previamente hecho al inocular; y por último, para las plantas inoculadas por el método de asperjado, el fragmento analizado fue la zona basal sobre el nivel de la tierra.

Los fragmentos seleccionados, fueron desinfectados superficialmente con alcohol 70% durante 1 minuto, enjuagados en agua estéril durante el mismo tiempo y luego secados en papel absorbente estéril. Posteriormente, se pesaron y se colocaron en tubos con 1 mL de agua estéril, donde fueron machacados. A partir de cada extracto se realizaron 6 diluciones seriadas al décimo (-1, -2, -3, -4, -5, -6). Se sembraron

20 μ L (gota) de cada dilución en placas de SCM, la cuales fueron divididas para sembrar todas las diluciones de una misma muestra en una única placa. Luego, se mantuvieron bajo corriente en flujo laminar hasta que las gotas se secaron. Posteriormente, las placas se incubaron a 28°C durante 4 – 5 días.

Para el análisis, se eligió la dilución donde había rango óptimo de colonias contables. El valor de recuento se expresó en ufc/g de tejido fresco y se calculó corrigiendo por el factor de dilución, el volumen sembrado y el peso de la muestra de tallo.

Se analizó un total de 3 plantas inoculadas con la cepa MAI 1001 con cada método de inoculación y también se analizaron plantas sintomáticas (nivel de marchitez 4) inoculadas con las otras tres cepas (MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050), con los tres métodos de inoculación.

4.5. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron en RStudio, versión 1.3.1093, utilizando un script cedido por el Ing. Agr. Pablo González Barrios (Facultad de Agronomía).

Para el análisis de agresividad se trabajó con un modelo lineal generalizado utilizando la función de `link=logit` sobre los valores de AUDPC. Se analizaron conjuntamente los datos de AUDPC de ambos experimentos, realizando un análisis de varianza (ANOVA) y considerando todas las interacciones posibles, en base a lo cual se procedió a analizar los datos de cada experimento individualmente.

Para cada conjunto de datos a evaluar, se realizó un ANOVA. Luego se realizó un ajuste de medias de mínimos cuadrados (ls, *least-square means*) por cepa y método, seguido de un análisis de Tukey para comparar la diferencia de las medias de AUDPC dentro de cada factor. En cada análisis se realizó una verificación de los residuales a través de QQ plot y gráficos residuales vs. predictos, los cuales se hicieron a través de la función *simulation output* del paquete DHARMA.

Los datos de los recuentos obtenidos a partir de plantas asintomáticas inoculadas por los diferentes métodos con la cepa MAI 1001 también se analizaron mediante ANOVA. En este caso también se verificaron los residuales como se describió anteriormente. Por último, se realizó un análisis de Tukey para comparar las medias de los valores de recuento de MAI 1001 entre los diferentes métodos de inoculación.

4.6. Análisis genómico de cepas de *C. michiganensis*

Para llevar a cabo el análisis genómico, se siguieron los siguientes pasos: extracción de ADN, secuenciación, análisis bioinformático.

Este análisis se realizó sobre las cuatro cepas de las cuales se analizó el comportamiento *in planta* (MAI 1001, MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050), y se incluyó una cepa más (MAI 1018).

4.6.1 Extracción de ADN genómico

Para la secuenciación por *Oxford Nanopore Technologies*, el ADN genómico fue extraído con un método de extracción clásico, adaptado por Ramponi (2018) a partir del método descrito por Sambrook & Russell, (2001). Se partió de 5 mL de cultivo líquido de cada cepa 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, cuya composición se encuentra en el apéndice. 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 (Cetyltrimethylammonium bromide)/NaCl, se mezcló vigorosamente y se incubó durante 10 minutos a 55°C. Se enfrió a 37°C durante unos minutos, se agregaron 500 µL de la mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó la muestra durante 15 minutos a 12500 rpm. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, se agregaron 2,5 µL de ARNasa A libre de DNasa (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 miliQ.

Para la secuenciación por Illumina, el ADN fue extraído utilizando el kit *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* de Thermo Scientific siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

La integridad de las muestras de ADN extraídas se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en *buffer* TBE 0,5X y tinción *Good View* (Ecoli s.r.o, Bratislava, Eslovaquia). Posteriormente, se realizó su cuantificación utilizando un fluorímetro Qubit Q32857 (Invitrogen). Adicionalmente se midió la relación $A_{260/280}$ y $A_{260/230}$ en un equipo Nanodrop ND-100 (*Nanodrop Technologies*) para evaluar su pureza.

4.6.2. Secuenciación de ADN genómico

La secuenciación de lecturas largas fue llevada a cabo utilizando un secuenciador MinION Mk1B (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) disponible en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Química. Las librerías fueron preparadas con el kit de ligación (SQK-LSK109) y la expansión *Native Barcoding Genomic DNA* (con EXP-NBD104, EXP-NBD11) siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante (versión NBE_9065_v109_revW_14Aug2019). Se ingresaron al secuenciador 303,6 ng del pool de ADN de las 5 cepas analizadas. Las librerías fueron secuenciadas en una celda de flujo Mk1 versión R9

(FLO-MIN106D) con una corrida de 17 horas 42 minutos utilizando el software MinKNOWN, versión 20.10.3 (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). La asignación de bases se realizó con el software Guppy, versión 5.0.17.

La preparación de librerías y secuenciación de lecturas cortas pareadas fue realizada por la empresa *Macrogen Inc* (Seoul, Korea), a través de la tecnología *Illumina NovaSeq*, cuya librería se preparó utilizando el kit *Truseq DNA Nano 350bp library*.

4.6.3. Análisis bioinformático

Se analizó la calidad de las lecturas utilizando FastQC y Falco, para las reads obtenidas por secuenciación con tecnología *Illumina* y *Nanopore* respectivamente. Además, se analizó la taxonomía de estas utilizando Kaiju en Kbase (www.kbase.us). Las lecturas largas fueron filtradas utilizando Filtlong, versión 0.2.1. Se generaron ensamblajes híbridos con el workflow estándar de Unicycler versión 0.4.8, los cuales fueron analizados mediante Quast, versión 5.0.2 y CheckM, versión 1.1.3. Para corroborar la taxonomía de los ensamblajes obtenidos, se cargaron los mismos en MiGA Online (www.microbial-genomes.org), Type Strain Genome Server (www.tygs.dsmz.de) y se calculó la identidad nucleotídica promedio (*Average Nucleotide Identity*, ANI) respecto a la cepa de referencia de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB 382 con el calculador de EzBiocloud (www.ezbiocloud.net).

Para los genomas donde se detectó presencia de contaminación (MAI 1023 Y MAI 1050), se realizó *binning* de los contigs utilizando MaxBin2 en Kbase (www.kbase.us), lo cual implica separar los contigs en grupos en base a similitudes en sus características. A los contigs seleccionados mediante *binning* y obtenidos por Unicycler, se les realizó un BLASTn contra la base de datos nt/nr. Se volvió a analizar la taxonomía de los *contigs* agrupados en *bins* y la calidad de estos, utilizando nuevamente las herramientas previamente mencionadas. Los genomas finales obtenidos fueron anotados con Prokka, versión 1.13.

A modo de identificar si algún *contig* se identificaba con algún plásmido de la cepa de referencia NCPPB 382, se realizó un *blastn* para cada *contig* de cada genoma, tomando la secuencia de la cepa de referencia NCPPB 382 desde la base de datos nt/nr de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). De la misma forma, se buscó si estaba presente la isla de patogenicidad *chp/tomA*, utilizando la secuencia de la cepa de referencia, obtenida de la base de datos anteriormente nombrada. Para generar el *heatmap* de porcentaje de identidad de los genes de virulencia presentes en cada cepa, se obtuvieron las secuencias aminoácidas de los factores de virulencia previamente caracterizados ([Tabla 8-1](#)) de la base de datos de NCBI y UniProtKB/Swiss-Prot. Posteriormente, se realizó un alineamiento tBlastn contra los genomas de las cinco cepas estudiadas. Los resultados se filtraron en

base a: identidad >40%, E-valor <10e-10, alineamiento >50% largo total del gen <4% gaps. Con los resultados obtenidos, se generó una matriz de porcentajes de identidad y se realizó un *heatmap* utilizando Pheatmap, versión 1.0.12 en RStudio, versión 1.3.1093. Con los genomas anotados previamente, se realizó un análisis comparativo en OrthoVenn2 (<https://orthovenn2.bioinfotoolkits.net/>), a modo de identificar los genes diferenciales para la cepa MAI 1001.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Cepas de *C. michiganensis* con agresividad diferencial en tomate

Para estudiar la virulencia de las cepas seleccionadas se utilizaron diferentes métodos de inoculación en plantas de tomate y se realizó el seguimiento de los síntomas generados *in planta*, asignando un nivel de marchitez en base a la cantidad de hojas afectadas (Figura 5-1). En la Figura 5-2 se puede observar una lesión característica del tipo cancro, generada en el sitio de inoculación por el método punción en tallo.

En la Figura 5-3 se representa la evolución de síntomas de marchitamiento para cada método de inoculación utilizado y en la tabla 5-1 se muestran los valores promedio de AUDPC calculados a partir de estos datos. En ambos casos, se muestran por separado los resultados obtenidos en dos experimentos independientes.

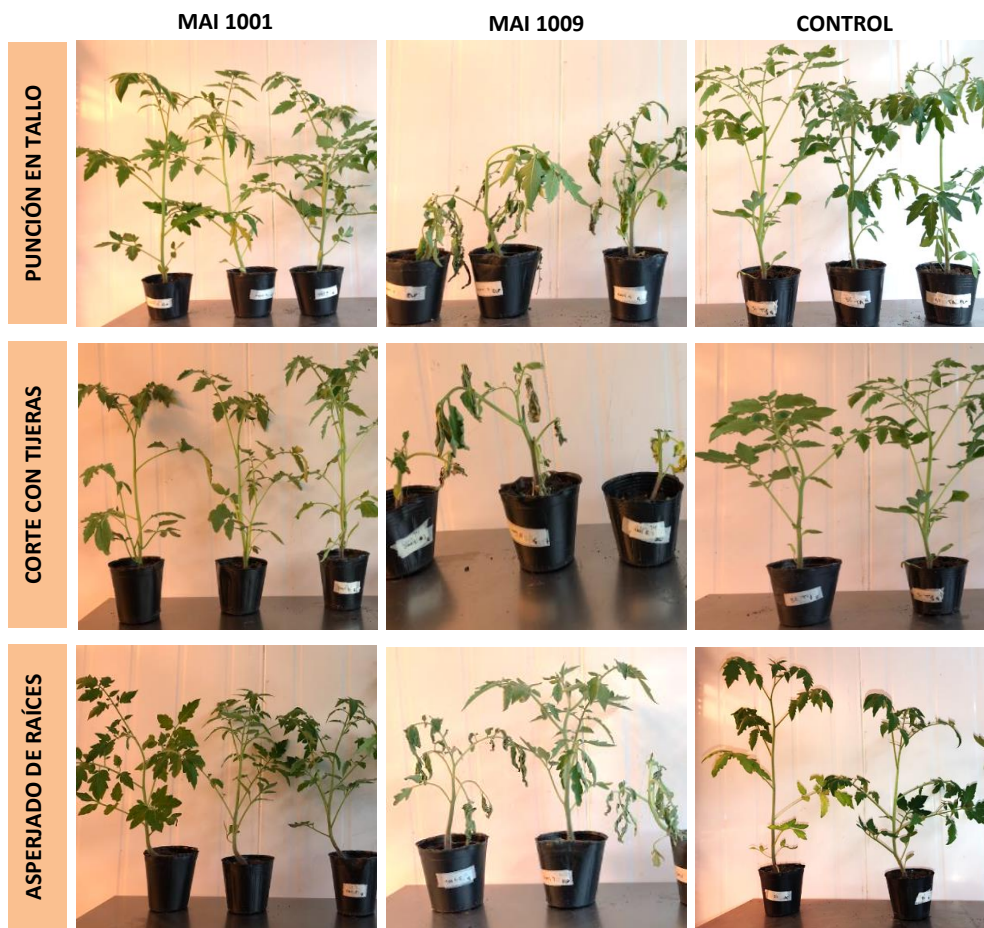


Figura 5-1. Imágenes representativas del ensayo de evaluación de la agresividad de cepas de *Clavibacter michiganensis* en tomate. Para cada método de inoculación utilizado se muestran plantas luego de 27 días de ser inoculadas con las cepas MAI 1001 y MAI 1009, así como plantas control inoculadas con agua.



Figura 5-2. Lesión característica del tipo cancro formada en el sitio de inoculación por punción en tallo.

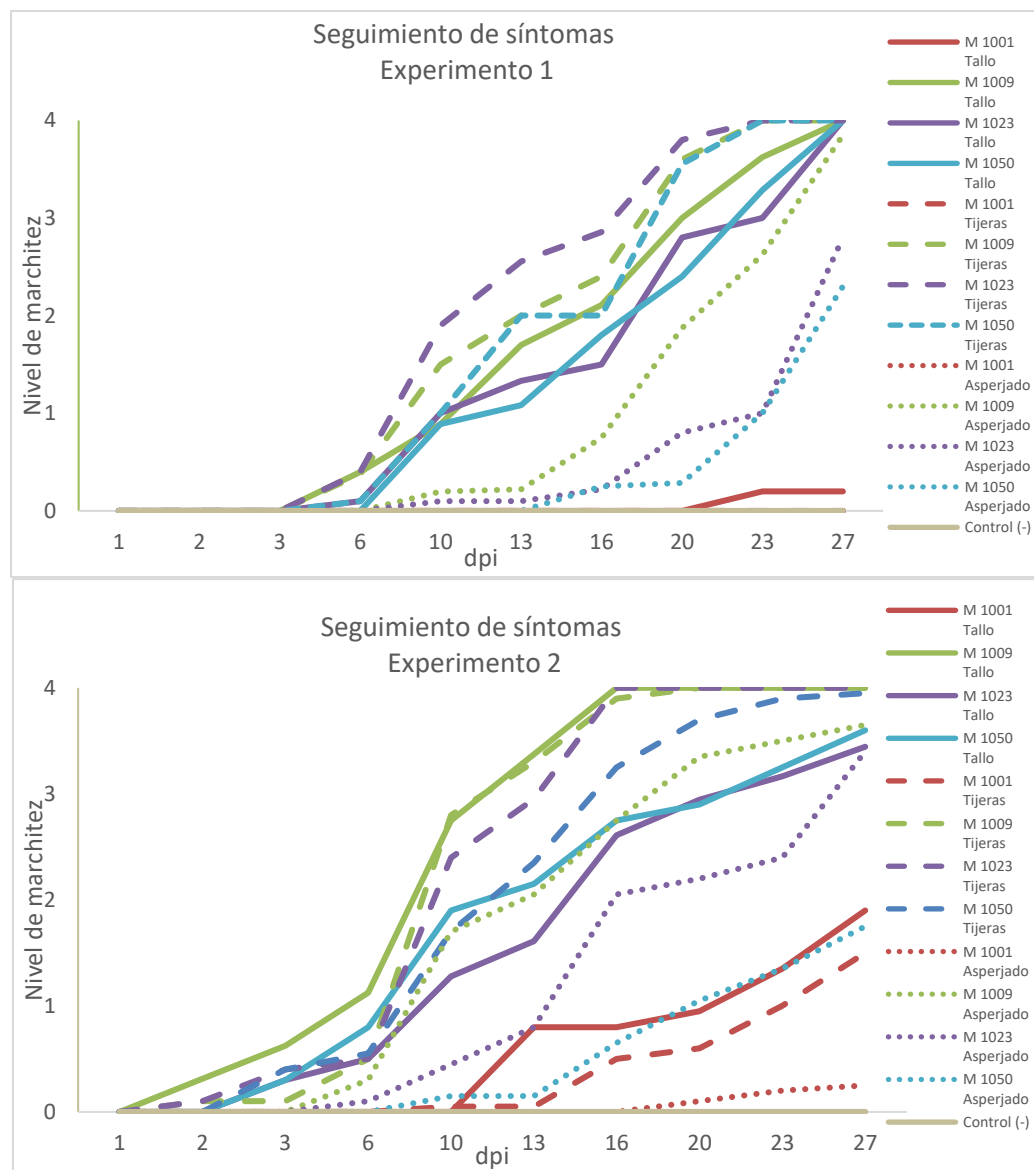


Figura 5-3. Seguimiento de síntomas de marchitamiento en plantas de tomate inoculadas con cepas de *Clavibacter michiganensis* (MAI 1001, MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050). Se utilizaron tres métodos de inoculación diferente: punción en tallo, cortes con tijeras y asperjado de raíces. Se muestran los resultados

de dos ensayos repetidos independientes.

Tabla 5-1. Valores promedio de área bajo la curva de progresión de síntomas (AUDPC) obtenidos en dos ensayos de inoculación de plantas de tomate con cepas de *Clavibacter michiganensis*.

ENSAYO 1				
	MAI 1001	MAI 1009	MAI 1023	MAI 1050
Punción en tallo	1,1 ± 2,3	33,5 ± 15,8	36,6 ± 15,3	40,6 ± 15,4
Corte con tijeras	0,0 ± 0,0	53,25 ± 9,5	60 ± 7,9	52,5 ± 6,8
Asperjado	0,0 ± 0,0	29,3 ± 15,2	14,1 ± 11,9	11,4 ± 10,9
ENSAYO 2				
	MAI 1001	MAI 1009	MAI 1023	MAI 1050
Punción en tallo	16,4 ± 16,6	76,1 ± 12,0	39,5 ± 12,6	45,1 ± 12,4
Corte con tijeras	9,9 ± 12,5	41,8 ± 3,1	56,7 ± 2,8	50,7 ± 10,3
Asperjado	1,5 ± 4,4	44,2 ± 17,7	29,5 ± 13,2	13,3 ± 12,9

Como puede apreciarse, las plantas control inoculadas con agua se mantuvieron asintomáticas a lo largo del período de evaluación. Por otro lado, se observa que independientemente del método de inoculación utilizado, la cepa MAI 1001 mostró una nula o muy baja agresividad en tomate, con una amplia predominancia de plantas que se mantuvieron asintomáticas hasta el final de cada ensayo. Este comportamiento es notoriamente diferente al observado para las otras cepas de Cm evaluadas, que fueron capaces de producir síntomas típicos de cancro bacteriano en todas las plantas inoculadas.

En el primer ensayo, todas las plantas inoculadas con la cepa MAI 1001 permanecieron asintomáticas a lo largo del período de evaluación de 27 días. Sólo dos plantas inoculadas mediante punción en tallo mostraron una leve sintomatología a los 23 y 27 dpi, que podría ser a causa de una leve deshidratación que se confundió con marchitez. Por otra parte, en el segundo ensayo, el nivel de agresividad alcanzado por esta cepa fue mayor, aunque para ninguno de los métodos de inoculación evaluados se logró superar un índice de marchitamiento promedio mayor a 2.

Otra conclusión general observada para ambos experimentos es que el método de asperjado de raíces se caracterizó por presentar una mayor variabilidad entre réplicas de un mismo tratamiento y por generar un menor desarrollo de síntomas de marchitamiento.

Los valores de AUDPC resultantes del seguimiento de síntomas fueron analizados estadísticamente para evaluar si existen diferencias significativas de agresividad entre las cepas de Cm y entre los métodos de inoculación utilizados. En una primera instancia, se realizó un ANOVA sobre el conjunto total de datos considerando todas las interacciones (entre cepa, método y ensayo) (Tabla 5-2).

Tabla 5-2. Resultado del análisis de varianza (ANOVA) realizado con datos combinados de ambos ensayos de inoculación y considerando todas las interacciones posibles (variable de respuesta: AUDPC).

	Chisq	Df	Pr(>Chisq)	
Experimento	11,312	1	0,0007699	***
Cepa	171,009	3	<2,2e-16	***
Método	146,151	2	<2,2e-16	***
Experimento:Cepa	11,696	3	0,0085010	**
Experimento: Método	25,299	2	3,209e-06	***
Cepa: Método	43,760	6	8,249e-08	***
Experimento:Cepa:Método	31,038	6	2,493e-05	***

Códigos de significancia: '***' 0.001 '**' 0.01

Dado que se encontró una interacción significativa de todos los factores con el factor experimento, se procedió a analizar los datos de cada experimento individualmente (Tabla 5-2). En el ANOVA correspondiente al experimento 1, se excluyó a la cepa MAI 1001 ya que por presentar un comportamiento completamente diferente al resto de las cepas, sus datos se diferenciaban del resto, afectando el análisis estadístico (datos no mostrados), presentando una agresividad prácticamente nula. Observando los p-valores obtenidos (Tabla 5-3), se evidencia que hay una interacción significativa entre los factores cepa y método, por lo que en cada ensayo se evaluaron estos factores de forma independiente.

Se encontraron diferencias significativas de agresividad asociadas al factor cepa, únicamente en el segundo ensayo. Por su parte, en el análisis realizado para el ensayo 1 no se incluyó a la cepa MAI 1001 y no se observaron diferencias significativas de agresividad para las otras tres cepas evaluadas. En la Figura 5-4 se muestra el análisis comparativo de agresividad entre cepas, considerando por separado cada método de inoculación utilizado.

Tabla 5-3. Resultado del análisis de varianza (ANOVA) para cada ensayo de inoculación por separado (variable de respuesta: AUDPC).

	ENSAYO 1				ENSAYO 2			
	Chisq	Df	Pr(>Chisq)		Chisq	Df	Pr(>Chisq)	
Cepa	0,8142	2	0,6656		250,770	3	<2,2e-16	***
Método	103,1294	2	<2,2e-16	***	85,814	2	<2,2e-16	***
Cepa:Método	10,1863	6	0,0374	*	73,082	6	9,524e-14	***

Códigos de significancia: '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05

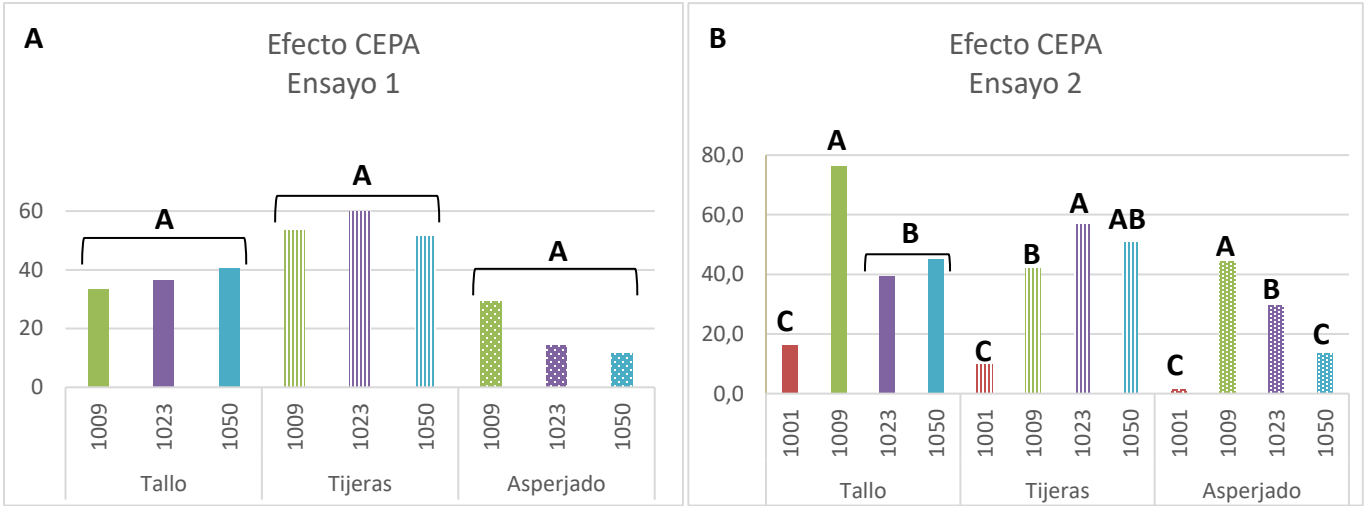


Figura 5-4. Análisis comparativo de la agresividad de cepas de *Clavibacter michiganensis* en tomate. Se grafican los valores promedio de AUDPC resultantes de las gráficas de seguimiento de síntomas de marchitamiento en plantas de tomate inoculadas con diferentes métodos (punción en tallo, corte con tijeras y asperjado de raíces). A.: Ensayo 1 (cepas MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050). B: Ensayo 2 (cepas MAI 1001, MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas para cada método de inoculación utilizado (test de comparación múltiple de Tukey, $p = 0.05$).

Con relación al factor cepa, un primer resultado a destacar es la notoria baja agresividad encontrada para la cepa MAI 1001. En el primer ensayo, esta cepa no fue capaz de generar síntomas de marchitamiento sobre la gran mayoría de las plantas inoculadas y por eso no fue incluida en el análisis estadístico. A su vez, en el segundo ensayo, y para todos los métodos de inoculación evaluados, se obtuvo para esta cepa un valor de agresividad significativamente más bajo a las otras cepas de Cm utilizadas, salvo para el método de asperjado con el que se observó además una baja agresividad para la cepa MAI 1050 (Figura 5-4B).

Las cepas MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050 presentaron en general alta agresividad siendo capaces de infectar y provocar síntomas severos de marchitamiento en ambos ensayos. En el primer ensayo, estas 3

cepas no presentaron diferencias significativas en su nivel de agresividad (Tabla 5-3, Figura 5-4A). En el segundo ensayo, la cepa MAI 1009 fue la más agresiva en 2 de los 3 los métodos de inoculación utilizados (inoculación por punción en tallo y por asperjado de raíces), seguida por la cepa MAI 1023, que presentó la mayor agresividad entre todas las cepas en la inoculación por corte con tijeras. La cepa MAI 1050 en este ensayo presentó niveles variables de agresividad según el método de inoculación. Por más que existen algunas diferencias en el ranking de las cepas, estos resultados están en concordancia con lo reportado por Ramponi (2018) en el que se utilizó el método de punción en tallo para evaluar la agresividad de cepas de diferentes secuenciotipos de *Cm* aisladas en Uruguay.

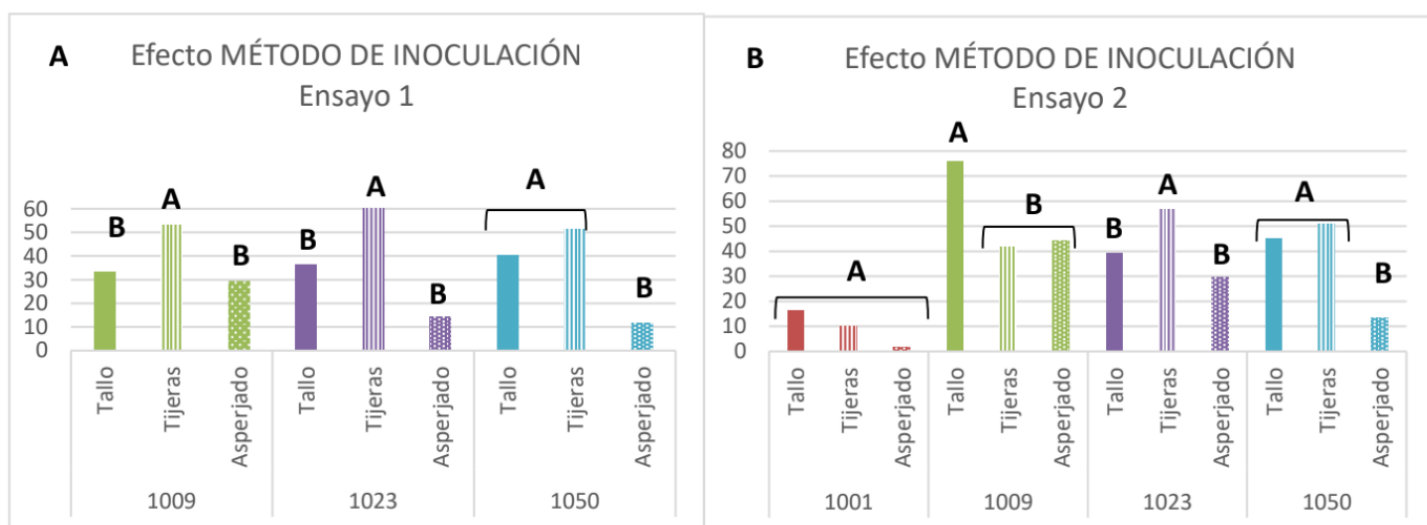


Figura 5-5. Análisis estadístico de los promedios de AUDPC resultantes de las gráficas de seguimiento de síntomas de marchitamiento en plantas de tomate inoculadas con cepas de *Clavibacter michiganensis*. A.: Ensayo 1 (cepas MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050). B: Ensayo 2 (cepas MAI 1001, MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre cepas para cada método de inoculación utilizado (test de comparación múltiple de Tukey, $p = 0.05$).

Podemos observar que, salvo para la cepa MAI 1001, se observaron diferencias significativas en la agresividad de los métodos de inoculación para el resto de las cepas evaluadas. El método de inoculación que generó mayor marchitez, por ende, el más agresivo, fue el método de inoculación por corte con tijeras. El método de inoculación por punción en tallo fue generalmente un poco menos agresivo, y por último, el asperjado de raíces. Esto se puede explicar porque al inocular por tijeras, se corta el tallo y se induce la emergencia de un nuevo brote. Por tratarse de un tejido joven, es esperable que la progresión de los síntomas sea más rápida que en las plantas más grandes como sucede en los otros métodos.

Observando estos datos y los de comparación de virulencia entre cepas para los diferentes métodos, podemos afirmar que el mejor método de inoculación para las evaluaciones de virulencia podría ser el de

inoculación por punción en tallo, ya que presenta una buena efectividad con baja o nula ocurrencia de escapes, y una agresividad intermedia lo que permite evaluar de forma más progresiva el desarrollo de síntomas en las plantas inoculadas y discriminar mejor entre cepas de virulencia alta e intermedia (Figura 5-5B).

La cepa MAI 1001 es capaz de multiplicarse in planta sin producir síntomas de marchitamiento. A modo de analizar la capacidad de colonización de la cepa MAI 1001, se analizó mediante recuento en microgota la concentración bacteriana a nivel del tallo en las plantas inoculadas que permanecieron asintomáticas al final del ensayo. Los resultados se pueden observar en la Figura 5-6.

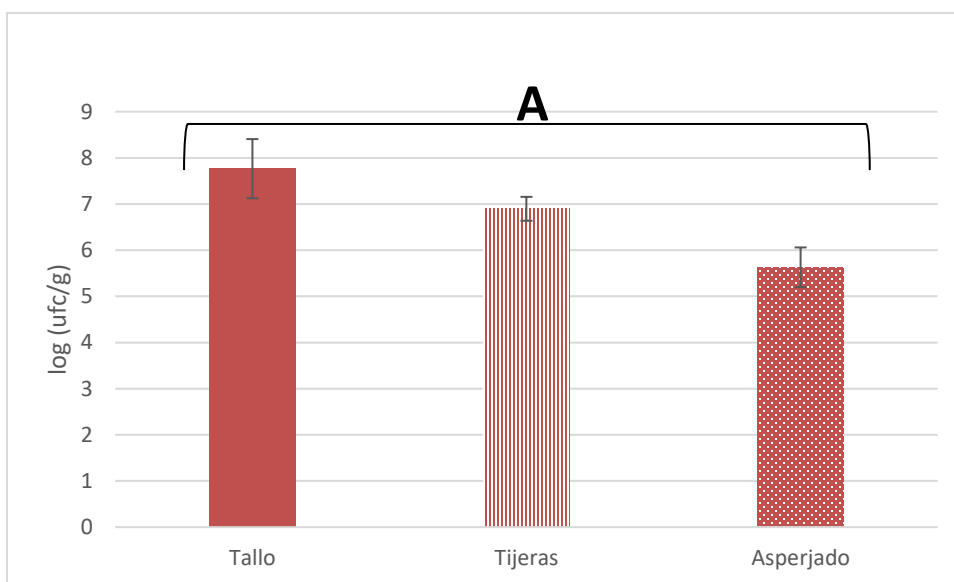


Figura 5-6. Resultados del recuento de *Clavibacter michiganensis* en plantas de tomate que permanecieron asintomáticas luego de 27 días de ser inoculadas con la cepa MAI 1001 por distintos métodos.

Para todos los métodos de inoculación utilizados y en todas las plantas asintomáticas analizadas, se logró detectar al patógeno a nivel del tallo en concentraciones variables en un rango de 10^4 a 10^9 ufc/g. Se observa también que estas concentraciones no tienen una diferencia significativa según el método de inoculación utilizado. Los datos del análisis estadístico se encuentran en el apéndice.

Por otro lado, se analizaron también al final del ensayo, plantas inoculadas con las cepas de Cm MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050 con un nivel 4 de marchitamiento. En estos casos, los valores de concentración bacteriana variaron en el orden de 10^8 a 10^{10} ufc/g (Tabla 5-4).

En primera instancia, podemos corroborar que las plantas asintomáticas inoculadas con la cepa MAI 1001 no corresponden a escapes de los métodos de inoculación, ya que en todos los casos se logró detectar al patógeno viable a nivel del tallo. Esto demuestra que esta cepa, a pesar de no desarrollar síntomas, es

capaz de diseminarse y multiplicarse activamente a nivel del xilema. Por otro lado, a pesar de no contar con un análisis exhaustivo del nivel de colonización de las diferentes cepas y métodos de inoculación, se observa que la concentración bacteriana alcanzada por la cepa MAI 1001 es menor a la desarrollada en el mismo tiempo por otras cepas más agresivas, confirmando así la correlación existente entre la aparición de síntomas de marchitamiento y la concentración del patógeno en los haces vasculares.

Podemos concluir entonces que la cepa de Cm MAI 1001 es una cepa no patogénica, debido a la notoria avirulencia observada al inocular las plantas de tomate y a su capacidad de reproducción *in planta*. Esto ha ocurrido previamente, y ha sido demostrado por estudios de cepas no patogénicas, las cuales colonizan el sistema vascular de las plantas, a niveles similares que cepas patogénicas (Peritore-Galve et al., 2021).

Tabla 5-4. Resultados del recuento por microgota de plantas con nivel de marchitez 4 inoculadas con las cepas MAI 1001, MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050 de *Clavibacter michiganensis* por distintos métodos.

Cepa	Método de inoculación	Recuento (ufc/g)
MAI 1009	Punción en tallo	$8,3 \times 10^8$
	Corte por tijeras	$2,1 \times 10^{10}$
	Asperjado de raíces	$1,3 \times 10^9$
MAI 1023	Punción en tallo	$1,6 \times 10^{10}$
	Corte por tijeras	$2,6 \times 10^{10}$
	Asperjado de raíces	$2,8 \times 10^8$
MAI 1050	Punción en tallo	$4,1 \times 10^9$
	Corte por tijeras	$3,0 \times 10^{10}$
	Asperjado de raíces	$9,7 \times 10^8$

5.2. Análisis genómico comparativo de cepas de *C. michiganensis* con virulencia diferencial en tomate

A modo de analizar más profundamente las cepas en estudio, se procedió a secuenciar y ensamblar sus genomas, los cuales posteriormente fueron estudiados utilizando herramientas bioinformáticas. Para evaluar la pureza de las muestras de ADN genómico extraído se midieron sus índices de absorbancia 260/280 y 260/230 (Tabla 5-5), evaluando su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 5-7). En las tablas 5-6 y 5.7 se muestran los resultados crudos obtenidos en las corridas de secuenciación de las cinco cepas de Cm en las plataformas *Illumina* y *Nanopore*.

Tabla 5-5. Concentraciones y parámetros de calidad de ADN extraído para la secuenciación genómica de cinco cepas de *Clavibacter michiganensis*

Cepa	Concentración (ng/μL)	Índice 260/280	Índice 260/230
1001	82,9	1,7	2,1
1009	71,6	1,7	2,1
1018	73,5	1,9	1,9
1023	70	1,9	2,2
1050	64,9	1,6	2,1

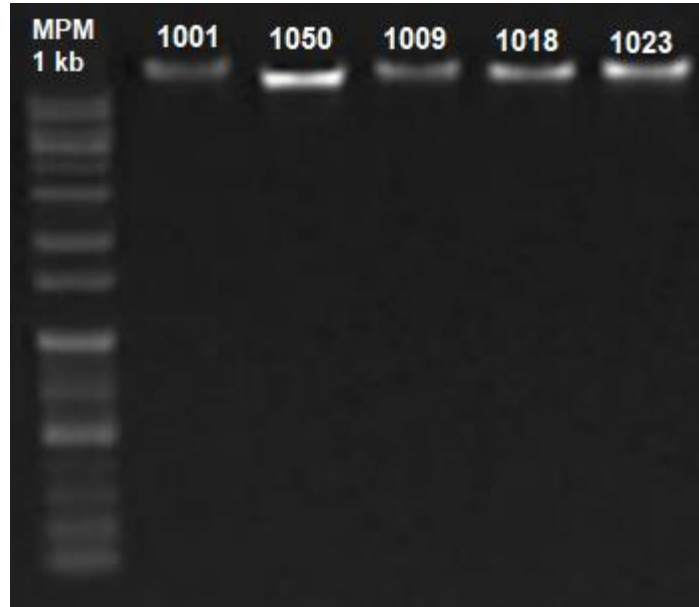


Figura 5-7. Electroforesis en gel de agarosa de muestras ADN genómico de cinco cepas de *Clavibacter michiganensis*

Tabla 5-6. Parámetros de calidad de lecturas secuenciadas en la plataforma MinION Nanopore

Cepa	N° lecturas	Bases totales (pb)	Q7(%)	Q10(%)
1001	19.004	115.925.836	100	66.6
1009	76.928	1.249.102.260	100	66.8
1018	73.513	1.256.626.723	100	96.1
1023	19.559	327.068.494	100	70.6
1050	183.066	1.059.596.364	100	68.2

Q7(%): porcentaje de bases con puntaje de calidad phred mayor de 7

Q10(%): porcentaje de bases con puntaje de calidad phred mayor de 10

Tabla 5-7. Parámetros de calidad de lecturas secuenciadas por la plataforma *Illumina*

Cepa	N° lecturas	Bases totales (pb)	Q20(%)	Q30(%)
1001	28.018.612	4.230.810.412	95.83	89.85
1009	26.130.704	3.945.736.304	95.79	89.79
1023	25.359.558	3.829.293.258	96.18	90.31
1050	22.469.342	3.392.870.642	96.39	90.23
1018	26.750.346	4.039.302.246	95.93	90.17

Q20(%): porcentaje de bases con puntaje de calidad phred mayor de 20

Q30(%): porcentaje de bases con puntaje de calidad phred mayor de 30

Al analizar las curvas de porcentaje GC de las lecturas obtenidas tanto por *Illumina* como por *Nanopore*, se detectó en algunos casos contaminación al evidenciar dos “picos” (ver [Apéndice 8-5](#)). Esto se confirmó posteriormente mediante el análisis de las mismas en Kaiju, donde se identificaron lecturas correspondientes a diferentes bacterias que no eran *Cm*.

Sin embargo, tras realizar el ensamblaje híbrido por Unicycler, se logró eliminar la contaminación en la mayoría de los genomas. Sin embargo, en los ensamblajes de las cepas MAI 1023 y MAI 1050, este problema continuó persistiendo, por lo que se procedió a realizar *binning* con MaxBin (agrupamiento de los *contigs* en grupos según sus características), pudiendo así descartar aquellos no asignados a *Cm*.

Una vez obtenidos los ensamblajes finales, para analizar su calidad, se utilizó CheckM y QUAST, cuyos resultados al analizar los genomas finales, se pueden observar en la Tabla 5-8.

Tabla 5-8. Resultados del análisis de calidad realizado por Quast y CheckM de los ensamblajes híbridos de cinco cepas de *Clavibacter michiganensis*.

Cepa	n° <i>contigs</i>	Largo total (pb)	<i>Contig</i> más largo (pb)	N50	N's	Compleitud (%)	Contaminación (%)
MAI 1001	3	3.418.901	3.306.422	3.306.422	0	99.49	0.0
MAI 1009	15	3.408.583	2.526.620	2.526.620	0	99.49	0.0
MAI 1018	3	3.412.055	3.325.121	3.325.121	0	99.49	0.0
MAI 1023	4	3.322.755	3.168.027	3.168.027	0	97.47	0.25
MAI 1050	8	3.113.069	1.697.964	1.697.964	0	92.24	0.0

Se obtuvieron ensamblajes híbridos de buena calidad, con alta completitud y baja o nula contaminación. Ninguno de ellos quedó cerrado, lo cual podría llegarse a lograr realizando un pulido de los mismos con

lecturas sin contaminación. Para esto, sería necesario realizar nuevas corridas de secuenciación para así mejorar los resultados de secuencia obtenidos.

Para la cepa MAI 1001, de gran relevancia en este análisis debido a su fenotipo contrastante de virulencia, se logró obtener tres *contigs*, con alta similitud respecto al cromosoma y ambos plásmidos de la cepa referencia NCPPB 382 (Tabla 5-10). Un resultado similar se obtuvo para la cepa MAI 1018, aunque en este caso, el *contig* asociado al plásmido pCM2 es de menor tamaño. Para las otras tres cepas de Cm secuenciadas, también se evidenció la presencia de plásmidos, aunque los mismos no pudieron ser ensamblados correctamente quedando asociados a varios *contigs*.

Tabla 5-10. Resultado obtenido por alineamiento (BLAST) de los contigs resultantes de los ensamblajes de las cinco cepas de *Clavibacter michiganensis* secuenciadas. Entre paréntesis se indica la cepa cuyo plásmido tiene mayor similitud con la secuencia (BLAST).

Cepa	N° contig	Elemento genético	Tamaño (pb)	% GC
MAI 1001	1	Cromosoma	3.304.422	72,68
	2	Plásmido (pCM2)	72.995	67,55
	3	Plásmido (pCM1)	39.484	66,68
MAI 1009	1	Cromosoma	1.943.382	72,22
	2	Cromosoma	869.791	73,19
	3	Cromosoma	489.654	73,42
	4	Plásmido (pCM2)	39.066	68,44
	5	Plásmido (pCM1)	33.056	67,69
	6	Plásmido (pCM2)	17.171	62,88
	7	Plásmido (pMSF1)	6.056	67,65
	8	Plásmido (pCM2)	3.995	67,61
	9	Plásmido (pVL1)	1.703	70,70
	10	Cromosoma	1.700	70,29
	11	Cromosoma	1.302	74,04
	12	Cromosoma	970	69,69
	13	Plásmido (pVL1)	722	67,45
	14	Plásmido (Plasmid/unnamed2)	328	63,72
	15	Cromosoma	239	67,78
MAI 1018	1	Cromosoma	3.325.121	72,62
	2	Plásmido (pCM2)	47.705	65,84
	3	Plásmido (pCM1)	39.229	67,50
MAI 1023	1	Cromosoma	3.168.027	72,77
	2	Plásmido (pCM2)	64.902	66,67
	3	Plásmido (pCM1)	47.339	68,87
	4	Plásmido (pCM1)	42.487	67,61
MAI 1050	1	Cromosoma	1.697.964	73,03
	2	Cromosoma	743.849	71,03
	3	Cromosoma	573.036	73,62
	4	Plásmido (pCM2)	70.302	67,47
	5	Plásmido (pCM1)	11.411	67,52
	6	Plásmido (pCM1)	9.640	66,90
	7	Plásmido (pCM1)	4.952	66,56
	8	Plásmido (pCM2)	1.915	58,96

Se realizó la asignación taxonómica de las cinco cepas secuenciadas mediante diferentes análisis a nivel genómico, verificando que todas pertenecen a la especie *Clavibacter michiganensis*. Según el análisis realizado en MiGA, la cepa tipo más cercana taxonómicamente es la cepa de Cm LMG7333^T. El análisis taxonómico realizado en la base de datos TYGS, también reveló alta similitud a nivel genómico entre la cepa tipo de Cm con los genomas de las cinco cepas secuenciadas en este trabajo (Tabla 5-11).

Tabla 5-11. Resultados obtenidos en la base TYGS para las cinco cepas secuenciadas: cepa tipo más cercana taxonómicamente, valores de hibridación ADN-ADN digital con la fórmula d_4 (dDDH, fórmula d_4) con sus respectivos intervalos de confidencialidad (C.I) y la diferencia en contenido G+C.

Cepa	Cepa más cercana taxonómicamente	dDDH (d_4 , en %)	C.I. (d_4 , %)	Diferencia en contenido G+C (%)
MAI 1001	LMG7333 ^T	92.5	[90.5 - 94.1]	0.23
MAI 1009	LMG7333 ^T	93.4	[91.6 - 94.9]	0.24
MAI 1018	LMG7333 ^T	92.4	[95.9 - 98.1]	0.26
MAI 1023	LMG7333 ^T	93.0	[94.5 - 97.3]	0.23
MAI 1050	LMG7333 ^T	92.0	[89.4 - 93.9]	0.25

Por su parte, se calculó el índice de similitud genómica ANI para las cinco cepas de Cm respecto a la cepa de referencia NCPPB 382, siendo en todos los casos >99% (Tabla 5-12).

Tabla 5-12. Porcentaje ANI de las cinco cepas secuenciadas de *Clavibacter michiganensis* respecto a la cepa referencia NCPPB 382 obtenido por EZBiocloud.

Cepa	ANI (%) respecto a cepa NCPPB 382
MAI 1001	99.08
MAI 1009	99.02
MAI 1018	99.09
MAI 1023	99.19
MAI 1050	99.05

Estos genomas fueron anotados utilizando Prokka, y las características de las anotaciones se muestran en la Tabla 5-13. Los datos de anotación dieron similares entre cepas y respecto a la cepa referencia NCPPB 382. Se observa que para MAI 1050, hay una menor cantidad de genes, lo cual puede deberse a los problemas de contaminación y procesamientos posteriores que debieron realizarse.

Tabla 5-13. Datos de anotación obtenidos por Prokka para los genomas secuenciados de las cinco cepas de *Clavibacter michiganensis*.

Cepa	CDS (n°)	Genes (n°)	tRNA (n°)	mRNA (n°)	rRNA (n°)
MAI 1001	3182	3242	52	3242	6
MAI 1009	3169	3229	52	3229	6
MAI 1018	3166	3226	52	3226	6
MAI 1023	3107	3164	49	3164	6
MAI 1050	2949	3005	48	3005	6

Para verificar la presencia e identidad de los genes reportados previamente como asociados a la virulencia en Cm ([Apéndice 8.1](#)), se generó un *Heatmap* de los porcentajes de identidad de estos en los ensamblajes obtenidos.

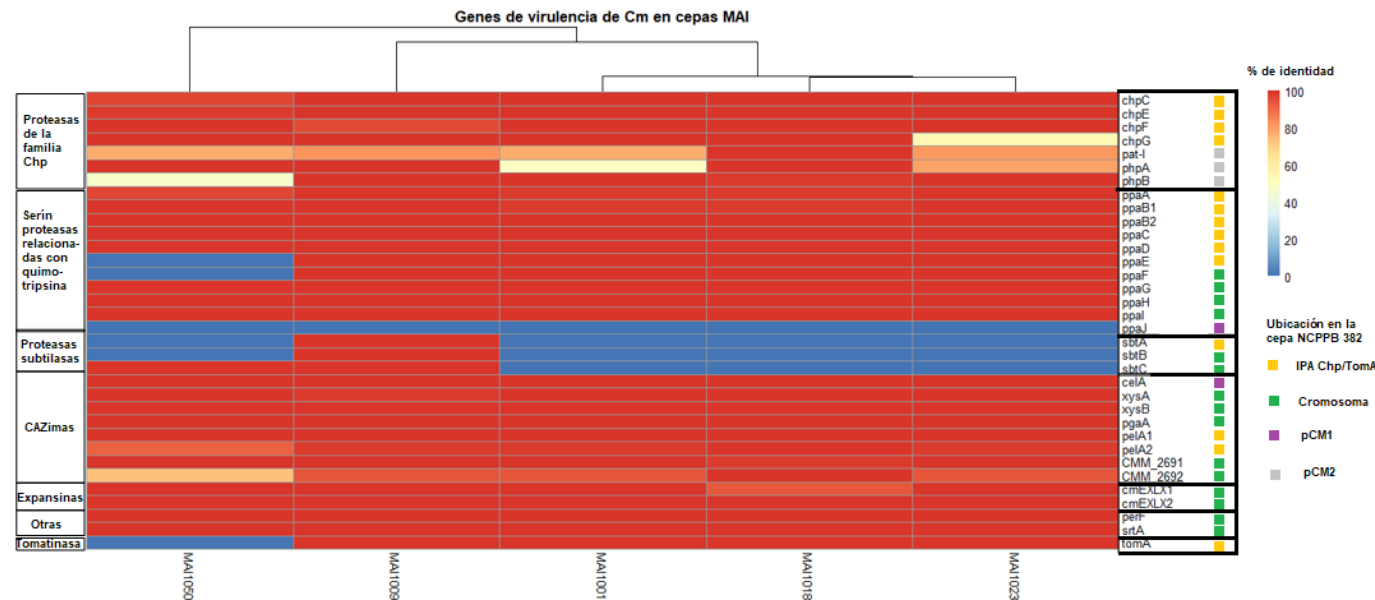


Figura 5-8. *Heatmap* de porcentajes de identidad de los genes de virulencia de *Clavibacter michiganensis* para los genomas ensamblados.

Podemos observar que no hay una diferencia evidente en la presencia/ausencia de genes de virulencia en la cepa MAI 1001 respecto al resto de las cepas, teniendo incluso mayores porcentajes de identidad en ciertos genes respecto a MAI 1023 y MAI 1050. La cepa MAI 1009 es la que tiene mayores porcentajes de identidad y en comparación con el resto de las cepas analizadas, podemos observar que contiene mayor

cantidad de proteasas. Esto podría explicar su virulencia aumentada respecto a las demás, ya que estas podrían facilitar la colonización bacteriana ya que degradan proteínas de la planta, además de permitir la adquisición de nutrientes ya que alteran la fisiología de la planta y modifican las respuestas de defensa vegetal (Nandi et al., 2018). También se logró mapear la IPA *chp/tomA* en los genomas de las cinco cepas secuenciadas mostrando altos porcentajes de identidad respecto a la secuencia correspondiente de la cepa NCPPB 382. (Tabla 5-14). La cepa MAI 1050 se destaca por presentar una menor cobertura de esta región, con algunos genes de virulencia faltantes o con baja identidad (ej. *tomA*).

Tabla 5-14. Resultado obtenido en BLAST de la búsqueda de la isla de patogenicidad *chp/tomA* de la cepa NCPPB 382 en los genomas ensamblados.

Cepa	Contig n°	Largo contig (pb)	% Identidad	% Coverage	N° Gaps	N° mismatches
1001	1	3.306.422	99.5	98.5	0	647
1009	1	3.324.820	99.6	98.5	0	507
1023	1	1.943.382	99.4	95.5	0	714
1050	2	743.849	99.3	61.1	0	524
1018	1	3.325.121	99.5	98.5	0	691

A modo de observar la coincidencia y diferencias en los genes presentes entre los genomas ensamblados, se procedió a realizar un diagrama de Venn en Orthovenn2, cuyo resultado se puede observar en la Figura 5-9.

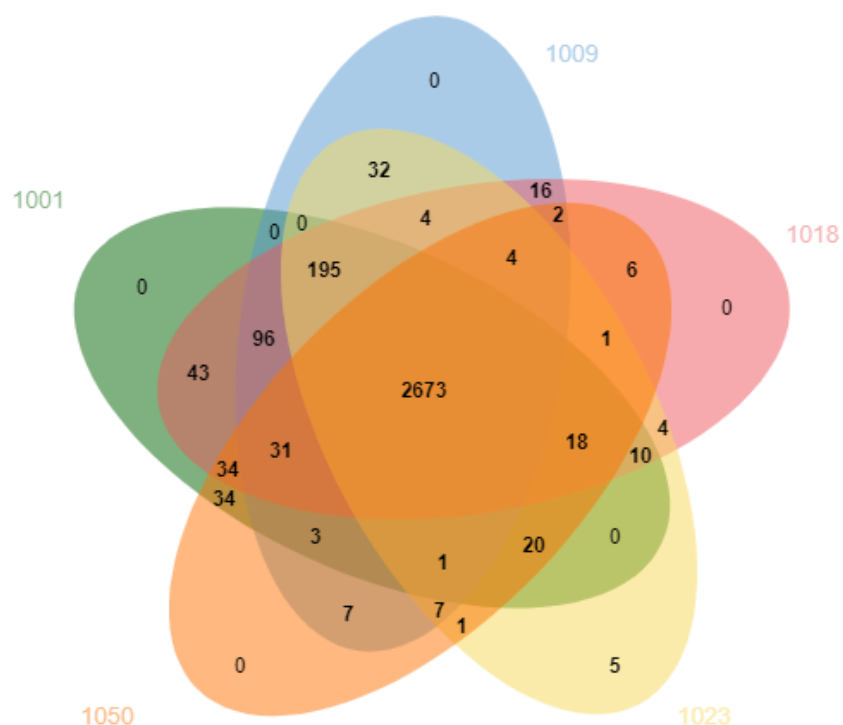


Figura 5-9. Diagrama de Venn obtenido en Orthovenn2: en las zonas de intersección se indican los números de genes compartidos entre los genomas secuenciados de *Clavibacter michiganensis*.

Podemos observar que las cuatro cepas de alta agresividad comparten 4 clústeres que no se encuentran en la cepa MAI 1001. En la Tabla 5-15 se encuentra información sobre los mismos obtenida mediante alineamiento tBlastn.

Tabla 5-15. Clústeres de proteínas presentes en las cepas de *Clavibacter michiganensis* de alta agresividad (MAI 1009, MAI 1018, MAI 1023 y MAI 1050) y ausentes en la cepa no virulenta MAI 1001.

Cluster	Proteínas en MAI 1009	Proteínas en MAI 1018	Proteínas en MAI 1023	Proteínas en MAI 1050
1	Proteína hipotética (<i>Clavibacter michiganensis</i>) WP_011931208.1 – pCM2 (NCPPB 382)			Proteína hipotética (<i>Clavibacter michiganensis</i>) WP_043560237.1 – pCM2 (NCPPB 382)
2	Ferritin-like domain-containing protein (<i>Clavibacter michiganensis</i>) WP_079531184.1 – Cromosoma (VQ143)			
3	Proteína hipotética (<i>Clavibacter michiganensis</i>) - WP_128517027.1 – pCM2 (NCPPB 382)			
4	Proteína hipotética (<i>Clavibacter michiganensis</i>) - WP_043560192.1 – pCM2 (NCPPB 382)			

Podemos observar que tres de las cuatro proteínas que MAI 1001 no codifica en su genoma, se corresponden con proteínas hipotéticas ubicadas en el plásmido pCM2 de la cepa referencia NCPPB 382, mientras que el restante se relaciona con una proteína con dominio *ferritin-like* presente en el cromosoma de la cepa VQ143. Al investigar sobre esta proteína en la base de datos de NCBI, la misma está conservada y presente en otras cepas de Cm. Según la anotación en la base de datos GO, la función de esta proteína está asociada con la respuesta celular a la sal, pero no existen reportes bibliográficos sobre su posible vinculación con la virulencia.

El resto de las proteínas que MAI 1001 carece y las otras tres cepas contienen, no se conoce su función, por lo que a priori no se puede realizar ninguna suposición en base a esto. Es llamativo de todas formas, que las tres proteínas se encuentran codificadas en el plásmido pCM2, cuya presencia fue asociada a la virulencia de Cm en varios estudios previos (Gartemann et al., 2003; Thapa et al., 2017).

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo de tesis permitió profundizar en la caracterización de cepas de *Cm* patógenas de tomate. Se logró evaluar la virulencia *in planta* de cepas de *Cm* seleccionadas mediante tres métodos de inoculación que intentan reproducir diferentes vías de infección de este patógeno. En todas las evaluaciones realizadas, se pudo corroborar la baja o nula agresividad que presenta la cepa MAI 1001. Este comportamiento fue contrastante respecto al resto de las cepas analizadas, dentro de las cuales MAI 1009 fue la que presentó mayor agresividad. Dentro de los métodos de inoculación utilizados, se concluye que el asperjado de raíces presenta una gran variabilidad respecto a la expresión de síntomas, en comparación con la inoculación por punción en tallo y corte con tijeras.

Se verificó además que la cepa MAI 1001, a pesar de no desarrollar síntomas, es capaz de colonizar los diferentes tejidos de la planta, diseminarse y multiplicarse activamente a nivel del xilema alcanzando concentraciones entre 10^4 - 10^9 ufc/g.

A nivel genómico, se utilizaron dos plataformas de secuenciación complementarias: *Illumina* y *Nanopore*. Se lograron secuenciar, ensamblar y comparar los genomas de cinco cepas de *Cm* con niveles de agresividad diferencial en tomate. A través de la comparación genómica, se pudo observar que la cepa MAI 1009 presentó mayores porcentajes de identidad respecto a genes de virulencia previamente reportados, presentando una mayor cantidad de proteasas respecto al resto de cepas, lo que podría explicar su mayor virulencia. Se observó también, que la cepa MAI 1001 carece de cuatro proteínas codificadas en los genomas de las cuatro cepas de *Cm* virulentas. Entre ellas, tres corresponden a proteínas de función desconocida codificadas en el plásmido pCM2. Se debería realizar un análisis más profundo a modo de poder determinar las funciones de estas proteínas para poder ver si éstas tienen relación con la menor virulencia de MAI 1001.

Como perspectivas también se propone complementar este estudio con la evaluación de la respuesta de la planta frente a la inoculación con cepas de *Cm* de alta y baja agresividad, mediante abordajes transcriptómicos y/o proteómicos.

7. REFERENCIAS

- Agrios, G. N. (2005). Plant pathology: fifth edition. In G. N. AGRIOS (Ed.), *Plant Pathology (Fifth Edition)*. Academic Press.
- Balaji, V., Mayrose, M., Sherf, O., Jacob-Hirsch, J., Eichenlaub, R., Iraki, N., Manulis-Sasson, S., Rechavi, G., Barash, I., & Sessa, G. (2008). Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiol*, 146, 1797–1809.
- Basu, P. K. (1970). Temperature, an Important Factor Determining Survival of *Corynebacterium michiganense* in Soil. *Phytopathology*, 60(5), 825.
- Beckers, G. J. M., Jaskiewicz, M., Liu, Y., Underwood, W. R., He, S. Y., Zhang, S., & Conrath, U. (2009). Mitogen-Activated Protein Kinases 3 and 6 Are Required for Full Priming of Stress Responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 21(3).
- Bermpohl, A., Dreier, J., Bahro, R., & Eichenlaub, R. (1996). Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. *Microbiol. Res*, 151, 391–399.
- Bryan, M. K. (1930). Studies on bacterial canker of tomato. *J. Agric. Res*, 41, 825–851.
- Burger, A., Grafen, I., Engemann, J., Niermann, E., Pieper, M., Kirchner, O., Gartemann, K.H., & Eichenlaub, R. (2005). Identification of homologues to the pathogenicity factor Pat-1, a putative serine protease of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microbiol. Res*, 160, 417–427.
- Carlton, W. M., Braun, E. J., & Gleason, M. L. (1998). Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into Tomato Leaves Through Hydathodes. *Phytopathology*®, 88(6).
- Chalupowicz, L., Barash, I., Reuven, M., Dror, O., Sharabani, G., Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R., Sessa, G., & Manulis-Sasson, S. (2017). Differential contribution of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* virulence factors to systemic and local infection in tomato. *Mol. Plant Pathol*, 18, 336–346.
- Chalupowicz, L., Zellermann, E.-M., Fluegel, M., Dror, O., Eichenlaub, R., Gartemann, K.-H., Savidor, A., Sessa, G., Iraki, N., Barash, I., & Manulis-Sasson, S. (2012). Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology*, 102, 23–31.
- Chang, R. J., Ries, S. M., & Pataky, J. K. (1992). Local sources of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathology*, 82, 553–560.

- Choi, H. W., & Klessig, D. F. (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biol*, 16, 232.
- Clarke, J., Wu, H.-C., Jayasinghe, L., Patel, A., Reid, S., & Bayley, H. (2009). Continuous base identification for single-molecule nanopore DNA sequencing. *Nature Nanotechnology*, 4(4).
- Coaker, G. L., & Francis, D. M. (2004). Mapping, genetic effects, and epistatic interaction of two bacterial canker resistance QTLs from *Lycopersicon hirsutum*. *Theor. Appl. Genet*, 108, 1047–1055.
- Collins, M. D., & Jones, D. (1980). Lipids in the classification and identification of coryneform bacteria containing peptidoglycans based on 2,4-diaminobutyric acid. *J. Appl. Bacteriol*, 48, 459–470.
- Croce, V. (2016). *Herramientas moleculares aplicables al control preventivo del cancro bacteriano del tomate en Uruguay*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Udelar.
- Croce, V., Pianzola, M. J., Durand, K., González-Arcos, M., Jacques, M.-A., & Siri, M. I. (2016). Multilocus Sequence Typing reveals high variability among *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains affecting tomato crops in Uruguay. *European Journal of Plant Pathology*, 144(1), 1–13.
- Davis, M. J., Gillaspie, A. G., Vidaver, A. K., & Harris, R. W. (1984). *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34, 107–117.
- de León, L., Siverio, F., López, M. M., & Rodríguez, A. (2011). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Dis.*, 95, 1328–1338.
- Dreier, J., Meletzus, D., & Eichenlaub, R. (1997). Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 10, 195–206.
- Eichenlaub, R., & Gartemann, K.-H. (2011). The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of Gram-positive bacterial plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*, 49, 445–464.
- Ellison, C. K., Kan, J., Chlebek, J. L., Hummels, K. R., Panis, G., Viollier, P. H., Biais, N., Dalia, A. B., & Brun, Y. v. (2019). A bifunctional ATPase drives tad pilus extension and retraction. *Sci. Adv*, 5:eaay2591.
- Fatmi, M., & Schaad, N. W. (1988). Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* from tomato seed. *Phytopathology*, 78, 121–126.
- Fatmi, M., & Schaad, N. W. (2002). Survival of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathol*, 51, 149–154.

- Flügel, M., Becker, A., Gartemann, K.-H., & Eichenlaub, R. (2012). Analysis of the interaction of *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* with its host plant tomato by genome-wide expression profiling. *Journal of Biotechnology*, 160(1–2), 42–54.
- Frenkel, O., Bornestein, M., Shulhani, R., Sharabani, G., Sofer, M., Abo-Moch, F., Lofthouse, M., Manulis-Sasson, S., & Shtienberg, D. (2016). Secondary spread of *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* in nurseries and the conditions leading to infection of tomato seedlings. *European Journal of Plant Pathology*, 144(3).
- Gartemann, K. H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., & Burger, A. (2003). *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*, 106(2–3), 179–191.
- Gartemann, K.H., Abt, B., B. T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., Gaigalat, L., Goesmann, A., Grafen, I., Kalinowski, J., Kaup, O., Kirchner, O., Krause, L., Linke, B., McHardy, A., Meyer, F., Pohle, S., Ruckert, C., Schneiker, S., Zellermann, E. M., Bartels, D. (2008). The genome sequence of the tomato pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. In *J. Bacteriol.* (Vol. 190, pp. 2138–2149).
- Gitaitis, R. D., Beaver, R. W., & Voloudakis, A. E. (1991). Detection of *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Dis*, 75, 834–838.
- Gleason, M. L. (1993). Recent Progress in Understanding and Controlling Bacterial Canker of Tomato in Eastern North America. *Plant Disease*, 77(11).
- Gleason, M. L., Braun, E. J., Carlton, W. M., & Peterson, R. H. (1991). Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology*, 81, 1519–1523.
- Goto, M. (2012). *Fundamentals of Bacterial Plant Pathology*.
- Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., & Yuan, Z.-C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories*, 15(1).
- Hadas, R., Kritzman, G., Klietman, F., Gefen, T., & Manulis, S. (2005). Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis ssp. michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathol*, 54, 643–649.
- Harrison, S. J. (1995). Differential Expression of Peroxidase Isogenes During the Early Stages of Infection of the Tropical Forage Legume *Stylosanthes humilis* by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8(3).
- Hendrickx, A. P. A., Budzik, J. M., Oh, S.-Y., & Schneewind, O. (2011). Architects at the bacterial surface — sortases and the assembly of pili with isopeptide bonds. *Nat. Rev. Microbiol*, 9, 166–176.

- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., & Matsui, H. (2001). A Large Family of Class III Plant Peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, 42(5).
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801–811.
- Hwang, I. S., Oh, E.-J., Lee, H. B., & Oh, C.-S. (2019). Functional characterization of two cellulase genes in the Gram-positive pathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* for wilting in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 32, 491–501.
- Illumina. (2018). *An introduction to Next-Generation Sequencing Technology*. <http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html>
- INIA. (2017). *Catálogo de cultivos hortícolas*.
- Jahr, H., Dreier, J., Meletzus, D., Bahro, R., & Eichenlaub, R. (2000). The endo-1,4-glucanase CelsA 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., Grafen, I., Zellermann, E.-M., Eichenlaub, R., & 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.
- Li, X. (Sean), & Yuan, X. (Kat). (2017). Genome Sequences for Multiple *Clavibacter* Strains from Different Subspecies. *Genome Announcements*, 5(38).
- Li, X., Tambong, J., Yuan, K. (Xiaoli), Chen, W., Xu, H., Lévesque, C. A., & de Boer, S. H. (2018). Re-classification of *Clavibacter michiganensis* subspecies on the basis of whole-genome and multi-locus sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68(1).
- Maeso Tozzi, D. C. (2020). El cancro bacteriano del tomate: aportes experimentales para su manejo integrado. *INIA Serie Técnica*, 254.
- Mayrose, M., Bonshtien, A., & Sessa, G. (2004). LeMPK3 Is a Mitogen-activated Protein Kinase with Dual Specificity Induced during Tomato Defense and Wounding Responses. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15).
- Meletzus, D., Bermphol, A., Dreier, J., & Eichenlaub, R. (1993). Evidence for plasmid-encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382. *Journal of Bacteriology*, 175(7).
- Méndez, V., Valenzuela, M., Salvà-Serra, F., Jaén-Luchoro, D., Besoain, X., Moore, E. R. B., & Seeger, M. (2020). Comparative genomics of pathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from Chile reveals potential virulence features for tomato plants. *Microorganisms*, 8(11).

- MGAP - DIEA. (2020). *Anuario estadístico agropecuario*.
- Nandi, M., Macdonald, J., Liu, P., Weselowski, B., & Yuan, Z.-C. (2018). *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management. *Mol. Plant Pathol*, 19, 2036–2050.
- Oh, E.-J., Hwang, I. S., Park, I. W., & Oh, C.-S. (2022). Comparative Genome Analyses of *Clavibacter michiganensis* Type Strain LMG7333T Reveal Distinct Gene Contents in Plasmids From Other *Clavibacter* Species. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- Pérez-Donoso, A. G., Greve, L. C., Walton, J. H., Shackel, K. A., & Labavitch, J. M. (2007). *Xylella fastidiosa* infection and ethylene exposure result in xylem and water movement disruption in grapevine shoots. *Plant Physiol*, 143, 1024–1036.
- Peritore-Galve, F. C., Miller, C., & Smart, C. D. (2020). Characterizing colonization patterns of *Clavibacter michiganensis* during infection of tolerant wild Solanum species. *Phytopathology*, 110, 574–581.
- Peritore-Galve, F. C., Schneider, D. J., Yang, Y., Thannhauser, T. W., Smart, C. D., & Stodghill, P. (2019). Proteome Profile and Genome Refinement of the Tomato-Pathogenic Bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *PROTEOMICS*, 19(7), 1800224.
- Peritore-Galve, F. C., Tancos, M. A., & Smart, C. D. (2021). Bacterial canker of tomato: Revisiting a global and economically damaging seedborne pathogen. *Plant Disease*, 105(6).
- Quesada-Ocampo, L. M., Landers, N. A., Lebeis, A. C., Fulbright, D. W., & Hausbeck, M. K. (2012). Genetic Structure of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Populations in Michigan Commercial Tomato Fields. *Plant Disease*, 96(6).
- Ramponi, C., & Siri, M. I. (2018). *Estudio comparativo de cepas aisladas en Uruguay de la bacteria fitopatógena Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis causante del cancro bacteriano del tomate*.
- Rapicavoli, J., Ingel, B., Blanco-Ulate, B., Cantu, D., & Roper, C. (2018). *Xylella fastidiosa*: an examination of a re-emerging plant pathogen. *Mol. Plant Pathol*, 19, 786–800.
- Reimers, P. J., Guo, A., & Leach, J. E. (1992). Increased Activity of a Cationic Peroxidase Associated with an Incompatible Interaction Between *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* and Rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiology*, 99(3).
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning a Laboratory Manual. In *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. (3th ed.). Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sangermani, M., Hug, I., Sauter, N., Pfohl, T., & Jenal, U. (2019). Tad pili play a dynamic role in *Caulobacter crescentus* surface colonization. *MBio*, 10, e01237-19.

- Savidor, A., Teper, D., Gartemann, K.-H., Eichenlaub, R., Chalupowicz, L., Manulis-Sasson, S., Barash, I., Tews, H., Mayer, K., Giannone, R. J., Hettich, R. L., & Sessa, G. (2012). The *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*–tomato interactome reveals the perception of pathogen by the host and suggests mechanisms of infection. *J. Proteome Res*, *11*, 736–750.
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition. *Plant Pathology*, *50*(6), 812–814
- Schaad, N. W., Jones, J., & W, C. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*.
- Sen, Y., Wolf, J., Visser, R. G. F., & Heusden, S. (2015). Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance, and interactions. *Plant Dis*, *99*, 4–13.
- Sharabani, G., Manulis-Sasson, S., Borenstein, M., Shulhani, R., Lofthouse, M., Chalupowicz, L., & Shtienberg, D. (2013). The significance of guttation in the secondary spread of *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* in tomato greenhouses. *Plant Pathol*, *62*, 578–586.
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (2018). Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, *122*(1).
- Smith, E. F. (1910). A new tomato disease of economic importance. *Science*, *31*, 794–796.
- Smith, E. F. (1914). The Grand Rapids tomato disease. In *Bacteria in Relation to Plant Diseases* (Vol. 3, pp. 161–165). Carnegie Institute.
- Stork, I., Gartemann, K.-H., Burger, A., & Eichenlaub, R. (2008). A family of serine proteases of *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*: chpC plays a role in colonization of the host plant tomato. *Mol. Plant Pathol*, *9*, 599–608.
- Svircev, A., Roach, D., & Castle, A. (2018). Framing the Future with Bacteriophages in Agriculture. *Viruses*, *10*(5), 218.
- Tancos, M. A., Chalupowicz, L., Barash, I., Manulis-Sasson, S., & Smart, C. D. (2013). Tomato Fruit and Seed Colonization by *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* through External and Internal Routes. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(22).
- Tancos, M. A., Lange, H. W., & Smart, C. D. (2015). Characterizing the genetic diversity of the *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis* population in New York. *Phytopathology*, *105*, 169–179.
- Tancos, M. A., Lowe-Power, T. M., Peritore-Galve, F. C., Tran, T. M., Allen, C., & Smart, C. D. (2018). Plant like bacterial expansins play contrasting roles in two tomato vascular pathogens. *Mol. Plant Pathol*, *19*, 1210–1221.
- Tettelin, H., & Medini, D. (2020). The pangenome: Diversity, dynamics and evolution of genomes. In *The Pangenome: Diversity, Dynamics and Evolution of Genomes*. Springer International Publishing.

- Thapa, S. P., O'Leary, M., Jacques, M.-A., Gilbertson, R. L., & Coaker, G. (2020). Comparative genomics to develop a specific multiplex PCR assay for detection of *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, 110, 556–566.
- Thapa, S. P., Pattathil, S., Hahn, M. G., Jacques, M.-A., Gilbertson, R. L., & Coaker, G. (2017). Genomic analysis of *Clavibacter michiganensis* reveals insight into virulence strategies and genetic diversity of a gram-positive bacterial pathogen. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 30, 786–802.
- Tomich, M., Planet, P. J., & Figurski, D. H. (2007). The tad locus: postcards from the widespread colonization island. *Nat. Rev. Microbiol*, 5, 363–375.
- van Loon, L. C., Rep, M., & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44(1).
- VanderMolen, G. E., Labavitch, J. M., Strand, L. L., & DeVay, J. E. (1983). Pathogen-induced vascular gels: ethylene as a host intermediate. *Physiol. Plant*, 59, 573–580.
- Vernikos, G., Medini, D., Riley, D. R., & Tettelin, H. (2015). Ten years of pan-genome analyses. *Current Opinion in Microbiology*, 23.
- Wang, Y., Deng, S., Li, Z., & Yang, W. (2022). Advances in the Characterization of the Mechanism Underlying Bacterial Canker Development and Tomato Plant Resistance. *Horticulturae*, 8(3).
- Windt, C. W., Vergeldt, F. J., Jager, P. A. D., & As, H. v. (2006). MRI of longdistance water transport: a comparison of the phloem and xylem flow characteristics and dynamics in poplar, castor bean, tomato and tobacco. *Plant Cell Environ*, 29, 1715–1729.

8. APÉNDICE

8.1. Genes de virulencia de *C. michiganensis*

Tabla 8-1. Genes de virulencia putativos y fenotipos observados al mutarse. Adaptado de: Peritore-Galve et. Al., (2021).

Ubicación en NCPPB 382 ^a	Gen	Severidad de síntomas en los tejidos de tomate al ser mutados ^b	Referencia(s)
Subfamilia de quimotripsinas proteasas S1A			
PAI	<i>chpA</i>	-	
PAI	<i>chpB</i>	-	
PAI	<i>chpC</i>	Reducido (marchitamiento y lesiones foliares)	Chalupowics et al. 2017; Stock et al. 2009
PAI	<i>chpD</i>	-	
PAI	<i>chpE</i>	Ninguno (marchitamiento y lesiones foliares)	Chalupowics et al. 2017
PAI	<i>chpF</i>	Ninguno (marchitamiento y lesiones foliares)	Chalupowics et al. 2018
PAI	<i>chpG</i>	Ninguno (marchitamiento y lesiones foliares)	Chalupowics et al. 2017; Stock et al. 2009
pCM2	<i>pat-I</i>	Reducido (marchitamiento) ^c	Dreier et al. 1997; Thapa et al. 2017
pCM2	<i>phpA</i>	Ninguno (marchitamiento)	Burger et al. 2005
pCM2	<i>phpB</i>	Ninguno (marchitamiento)	Burger et al. 2006
Serín proteasas tipo quimotripsina			
PAI	<i>ppaA</i>	Ninguno (marchitamiento y lesiones foliares)	Chalupowics et al. 2017
PAI	<i>ppaB1</i>	-	
PAI	<i>ppaB2</i>	-	
PAI	<i>ppaC</i>	Ninguno (marchitamiento y lesiones foliares)	Chalupowics et al. 2017
PAI	<i>ppaD</i>	-	
PAI	<i>ppaE</i>	-	
Crom	<i>ppaF</i>	-	
Crom	<i>ppaG</i>	-	
Crom	<i>ppaH</i>	-	
Crom	<i>ppaI</i>	-	

pCM1	<i>ppaJ</i>	-	
Proteasas subtilasas			
PAI	<i>sbtA</i>	Reducido (marchitamiento y lesiones foliares)	Chalupowics et al. 2017
Crom	<i>sbtB</i>	Ninguno (marchitamiento y lesiones foliares)	Chalupowics et al. 2018
Crom	<i>sbtC</i>	Ninguno (marchitamiento y lesiones foliares)	Chalupowics et al. 2019
Celulasas			
pCM1	<i>CelA</i>	Avirulenta (marchitamiento) ^c	Hwang et al. 2019; Jahr et al. 2000; Peritore-Galve et al. 2020; Tancos et al. 2015, 2018; Thapa et al. 2017, 2020
Crom	<i>CelB</i>	Ninguno (marchitamiento y lesiones foliares) ^c	Chalupowicz et al. 2017; Hwang et al. 2019
Xilanasas			
Crom	<i>xysA</i>	Ninguno (marchitamiento y lesiones foliares)	Chalupowics et al. 2017
Crom	<i>xysB</i>	Ninguno (marchitamiento y lesiones foliares)	Chalupowics et al. 2018
Pectinasas			
Crom	<i>pgaA</i>	Reducido (lesiones foliares); ninguno (marchitamiento)	Chalupowics et al. 2017
PAI	<i>pelA1</i>	Reducido (marchitamiento) ^d	Thapa et al. 2017
PAI	<i>pelA2</i>	Reducido (marchitamiento) ^d	Thapa et al. 2018
Endoglucanasas			
Crom	<i>endX/Y</i> (<i>CMM_2691</i> y <i>CMM_2692</i>)	Reducido (lesiones foliares); ninguno (marchitamiento)	Chalupowics et al. 2017
Expansinas			
pCM1	<i>CmEXLX1</i> (dominio expansina de <i>CelA</i>)	Reducido (marchitamiento) ^c	Hwang et al. 2019; Jahr et al. 2000
Crom	<i>expA</i> (<i>CmEXLX2</i>)	Aumentado (marchitamiento y lesiones en frutos) ^d	Peritore-Galve et al. 2020; Tancos et al. 2018

Otras			
Crom	<i>perF</i> (<i>perforina</i>)	Reducido (lesiones foliares); ninguno (marchitamiento)	Chalupowics et al. 2017
Crom	<i>srtA</i> (<i>sortasa</i>)	Reducido (lesiones foliares); ninguno (marchitamiento)	Chalupowics et al. 2018
PAI	<i>tomA</i> (<i>tomatinasa</i>)	Ninguno (marchitamiento)	Kaup et al. 2005
^a PAI = isla de patogenicidad <i>chp/tomA</i> ; Crom = regiones cromosómicas fuera de PAI			
^b "-" indica que no hay estudios genéticos funcionales reportados para ese gen			
^c Genes que reducen la virulencia al ser silenciados en NCPPB 382 pero tienen resultados contrarios al ser silenciados o estar ausentes en otras cepas virulentas			
^d Genes cuyo fenotipo virulento fue determinado en una cepa diferente a NCPPB 382			

8.2. Medios de cultivo

8.2.1. Medio de cultivo general

Tabla 8-2. 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 masa cada componente y se agrega el agua destilada. Se homogeneiza y ajusta el pH a 7,2. Se esteriliza en autoclave 15 minutos a 121°C. Se reparte en placas de Petri, con aproximadamente 20 mL cada una. Se secan las placas a temperatura ambiente y se conservan a 4°C hasta su uso.

8.2.2. Medio de cultivo semiselectivo

Tabla 8-3. Composición del medio *Selective Clavibacter michiganensis* (SCM) (Fatmi & Schaad, 1988)(

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

Se masa cada componente y se agrega el agua destilada. Se homogeneiza y ajusta el pH a 7,2. Se esteriliza en autoclave 15 minutos a 121°C, se deja enfriar a 45-50°C y se agregan los antibióticos que se listan a continuación (previamente esterilizados por filtración

Tabla 8-4. Composición del medio *Selective Clavibacter michiganensis* (SCM) (Fatmi & Schaad, 1988)

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

Tras ser añadidos los antibióticos, se reparte en placas de Petri, con aproximadamente 20 mL cada una. Se secan las placas a temperatura ambiente y se conservan a 4°C hasta su uso.

8.3. Buffers

8.3.1. Buffer TBE 10X

Tabla 8-5. Composición del buffer TBE 10X

Componente	Cantidad
Tris base	108 g
Ácido bórico	55 g
Agua destilada	900 mL
Sol. EDTA 0.5 M (pH 8.0)	40 mL

Para preparar buffer TBE 0.5X se hace una dilución 1/20 de la solución stock 10X. Se pesa cada componente y se agrega el agua destilada. Se homogeneiza.

8.3.2. Buffer TE25S

Tabla 8-6. Composición del buffer TE25S

Componente	Cantidad
Sacarosa	10.3 g
EDTA 0.5M pH 8.0	5 mL
Sol. Tris-Cl 1M pH 8.0	2.5 mL

Se ajusta el pH a 8.0 y se lleva a 100 mL con agua destilada. Se esteriliza en autoclave 15 minutos a 121°C.

8.4. Resultados

8.4.1. Análisis estadístico de ambos experimentos

En la tabla 5-2 se encuentran los resultados del ANOVA realizado con los datos de AUDPC de ambos experimentos, a partir de los cuales se decidió analizar por separado los datos de cada experimento debido a que se observó interacción de los factores Cepa y Método con el factor Experimento. En la Figura 8-1 se observa el QQ plot obtenido del análisis de los residuales del ANOVA anteriormente mencionado, donde se observa que los datos se ajustan adecuadamente.

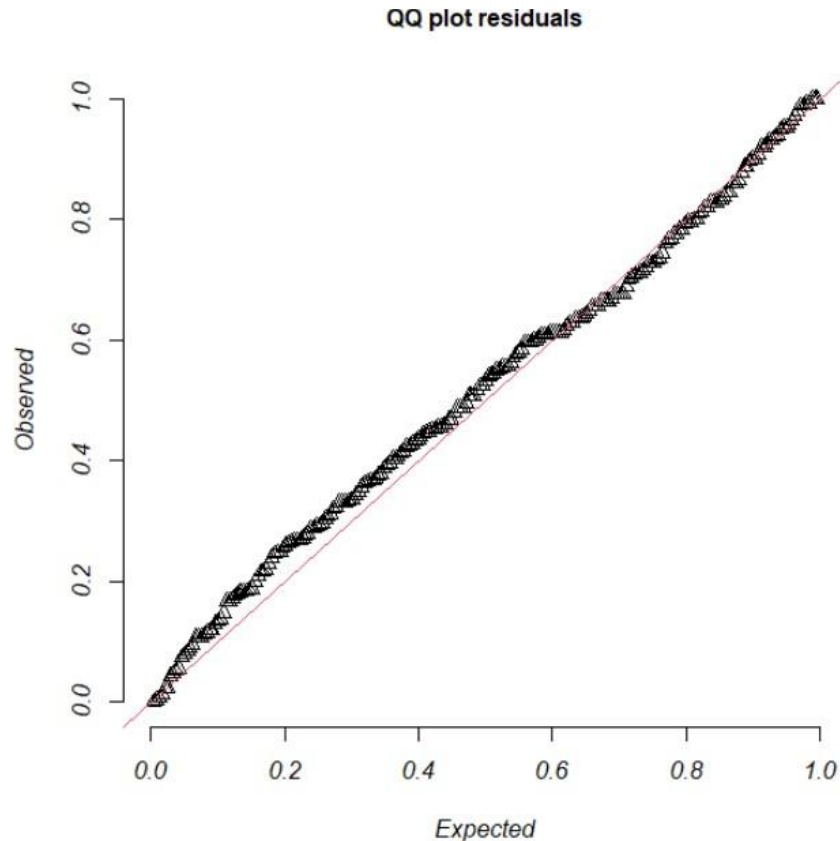


Figura 8-1. QQplot resultante del análisis de residuales obtenidos del ANOVA realizado con los datos de ambos experimentos.

8.4.2. Análisis estadístico de los datos del experimento 1

En la tabla 5-3 se encuentran los resultados del ANOVA realizado con los datos obtenidos en el experimento 1 de AUDPC de las cepas MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050 y en la [Figura 8-2](#) el QQ plot obtenido al analizar los residuales del mismo, donde se observa que los datos se ajustan adecuadamente. En la tabla 8-7 se observa el resumen del ajuste de las medias de mínimos cuadrados (lsm, *Least-square means*) por cepa y por método de los datos de AUDPC. Para evaluar la diferencia de las lsm de cada cepa según el método de inoculación utilizado se realizó un análisis de Tukey, cuyo resultado se expresa en la tabla 8-8. También se ajustaron las medias de mínimos cuadrados para comparar las lsm de cada cepa mediante un análisis de Tukey a modo de estudiar las diferencias de virulencia entre ellas para cada método de inoculación utilizado, en la tabla 8-9 se observa el resultado de este ajuste de lsm, y en la tabla 8-10 el resultado del análisis de Tukey.

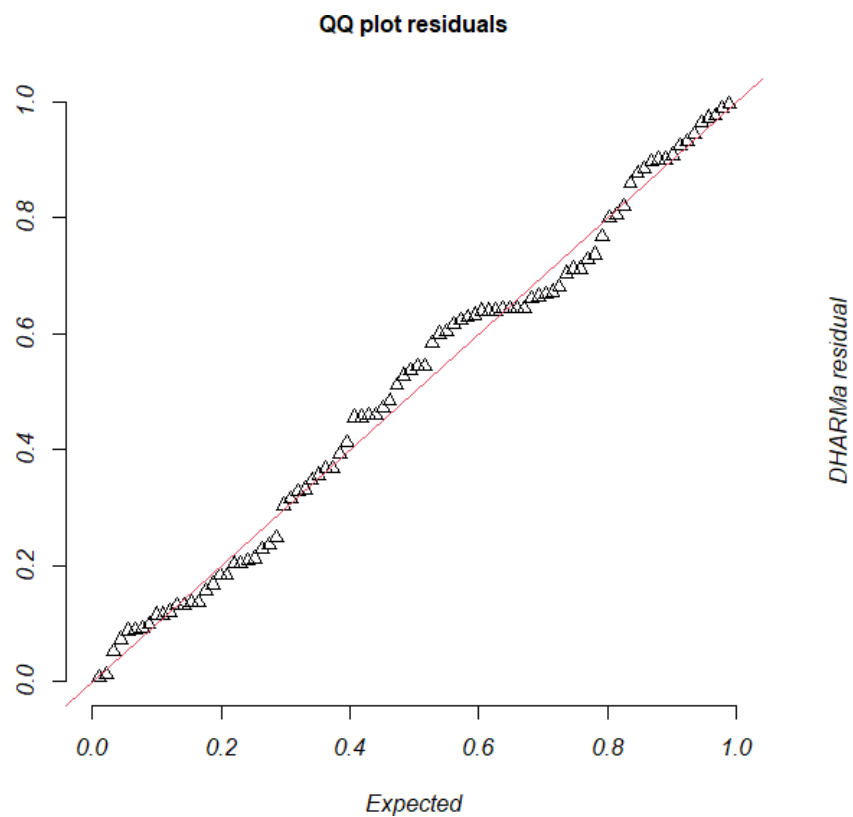


Figura 8-2. QQplot resultante del análisis de residuales obtenidos del ANOVA realizado con los datos de las AUDPC de las cepas MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050 del experimento 1.

Tabla 8-7. Resultado del ajuste de medias por mínimos cuadrados por cepa y método realizado con datos de AUDPC del experimento 1, de las cepas MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050.

	Cepa	Metodo	lsmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
1	1009	Asperjado	29,24961	3,690946	76	21,89845	36,60076
2	1023	Asperjado	19,46265	4,548655	76	10,40322	28,52208
3	1050	Asperjado	15,46114	4,509065	76	6,480554	24,44172
4	1009	Tallo	33,52387	3,690946	76	26,17272	40,87503
5	1023	Tallo	36,54756	3,703151	76	29,1721	43,92302
6	1050	Tallo	40,57427	3,690946	76	33,22311	47,92542
7	1009	Tijeras	53,24894	3,690946	76	45,89779	60,6001
8	1023	Tijeras	59,97428	3,690946	76	52,62313	67,32544
9	1050	Tijeras	51,52423	3,690946	76	44,17307	58,87538

Tabla 8-8. Resultado del análisis de Tukey de los valores de lsm de las cepas MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050 para evaluar en cada cepa la diferencia entre sí misma según el método de inoculación utilizado, experimento 1.

	contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
1	1009 Asperjado - 1023 Asperjado	9,786954	5,855836	76	1,671316	0,761663
2	1009 Asperjado - 1050 Asperjado	13,78847	5,825163	76	2,367053	0,317026
3	1009 Asperjado - 1009 Tallo	-4,27427	5,216525	76	-0,81937	0,99594
4	1009 Asperjado - 1023 Tallo	-7,29795	5,22073	76	-1,39788	0,895234
5	1009 Asperjado - 1050 Tallo	-11,3247	5,216525	76	-2,17092	0,434802
6	1009 Asperjado - 1009 Tijeras	-23,9993	5,216525	76	-4,60064	0,000538
7	1009 Asperjado - 1023 Tijeras	-30,7247	5,216525	76	-5,88987	3,45E-06
8	1009 Asperjado - 1050 Tijeras	-22,2746	5,216525	76	-4,27001	0,001751
9	1023 Asperjado - 1050 Asperjado	4,001515	6,402786	76	0,624965	0,999409
10	1023 Asperjado - 1009 Tallo	-14,0612	5,855834	76	-2,40123	0,298464
11	1023 Asperjado - 1023 Tallo	-17,0849	5,861398	76	-2,91482	0,101345
12	1023 Asperjado - 1050 Tallo	-21,1116	5,855835	76	-3,60523	0,015373
13	1023 Asperjado - 1009 Tijeras	-33,7863	5,855834	76	-5,76968	5,66E-06
14	1023 Asperjado - 1023 Tijeras	-40,5116	5,855835	76	-6,91816	4,44E-08
15	1023 Asperjado - 1050 Tijeras	-32,0616	5,855835	76	-5,47515	1,87E-05
16	1050 Asperjado - 1009 Tallo	-18,0627	5,825162	76	-3,10081	0,063722
17	1050 Asperjado - 1023 Tallo	-21,0864	5,830807	76	-3,61638	0,014861
18	1050 Asperjado - 1050 Tallo	-25,1131	5,825163	76	-4,31115	0,001517
19	1050 Asperjado - 1009 Tijeras	-37,7878	5,825162	76	-6,487	2,82E-07
20	1050 Asperjado - 1023 Tijeras	-44,5131	5,825163	76	-7,64153	1,81E-09
21	1050 Asperjado - 1050 Tijeras	-36,0631	5,825163	76	-6,19092	9,87E-07
22	1009 Tallo - 1023 Tallo	-3,02369	5,22073	76	-0,57917	0,999662
23	1009 Tallo - 1050 Tallo	-7,0504	5,216525	76	-1,35155	0,911909
24	1009 Tallo - 1009 Tijeras	-19,7251	5,216525	76	-3,78127	0,008909
25	1009 Tallo - 1023 Tijeras	-26,4504	5,216525	76	-5,0705	9,18E-05
26	1009 Tallo - 1050 Tijeras	-18,0004	5,216525	76	-3,45064	0,024332
27	1023 Tallo - 1050 Tallo	-4,02671	5,22073	76	-0,77129	0,99733

28	1023 Tallo - 1009 Tijeras	-16,7014	5,22073	76	-3,19905	0,049183
29	1023 Tallo - 1023 Tijeras	-23,4267	5,22073	76	-4,48725	0,000812
30	1023 Tallo - 1050 Tijeras	-14,9767	5,22073	76	-2,86869	0,113068
31	1050 Tallo - 1009 Tijeras	-12,6747	5,216525	76	-2,42972	0,283497
32	1050 Tallo - 1023 Tijeras	-19,4	5,216525	76	-3,71895	0,010835
33	1050 Tallo - 1050 Tijeras	-10,95	5,216525	76	-2,09909	0,481701
34	1009 Tijeras - 1023 Tijeras	-6,72534	5,216525	76	-1,28924	0,931502
35	1009 Tijeras - 1050 Tijeras	1,724716	5,216525	76	0,330625	0,999995
36	1023 Tijeras - 1050 Tijeras	8,450055	5,216525	76	1,619863	0,790988

Tabla 8-9. Resultado del ajuste de medias de las cepas por lsm para evaluar la diferencia entre ellas según los métodos de inoculación utilizados, experimento 1.

	Cepa	Metodo	lsmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
1	1009	Asperjado	29,24961	3,690946	76	21,89845	36,60076
2	1023	Asperjado	19,46265	4,548655	76	10,40322	28,52208
3	1050	Asperjado	15,46114	4,509065	76	6,480554	24,44172
4	1009	Tallo	33,52387	3,690946	76	26,17272	40,87503
5	1023	Tallo	36,54756	3,703151	76	29,1721	43,92302
6	1050	Tallo	40,57427	3,690946	76	33,22311	47,92542
7	1009	Tijeras	53,24894	3,690946	76	45,89779	60,6001
8	1023	Tijeras	59,97428	3,690946	76	52,62313	67,32544
9	1050	Tijeras	51,52423	3,690946	76	44,17307	58,87538

Tabla 8-10. Resultado del Tukey comparando las lsm de las cepas MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050 a modo de comparar la diferencia de virulencia entre ellas para cada método de inoculación utilizado, experimento 1.

	contrast	Metodo	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
1	1009 - 1023	Asperjado	9,786954	5,855836	76	1,671316	0,222835
2	1009 - 1050		13,78847	5,825163	76	2,367053	0,052865
3	1023 - 1050		4,001515	6,402786	76	0,624965	0,806903
4	1009 - 1023	Tallo	-3,02369	5,22073	76	-0,57917	0,83164
5	1009 - 1050		-7,0504	5,216525	76	-1,35155	0,371468
6	1023 - 1050		-4,02671	5,22073	76	-0,77129	0,721689
7	1009 - 1023	Tijeras	-6,72534	5,216525	76	-1,28924	0,405585
8	1009 - 1050		1,724716	5,216525	76	0,330625	0,941571
9	1023 - 1050		8,450055	5,216525	76	1,619863	0,243554

8.4.3. Análisis estadístico de los datos del experimento 2

En este caso sí se observaron leves síntomas en las plantas inoculadas con la cepa MAI 1001, por lo que sus datos se analizaron también.

En la tabla 5-3 se encuentran los resultados del ANOVA realizado con los datos obtenidos en el experimento 1 de AUDPC de las cepas MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050 y en la Figura 8-3 el QQ plot obtenido al analizar los residuales del mismo, donde se observa que los datos se ajustan adecuadamente. En la tabla 8-11 se observa el resumen del ajuste de las medias de mínimos cuadrados (lsm. Least-square means) por cepa y por método de los datos de AUDPC. Para evaluar la diferencia de las lsm de cada cepa según el método de inoculación se realizó un análisis de Tukey, cuyo resultado se expresa en la tabla 8-12. También se ajustaron las medias de mínimos cuadrados para comparar las lsm de cada cepa mediante un análisis de Tukey a modo de estudiar las diferencias de virulencia entre ellas según cada método de inoculación utilizado, en la tabla 8-13 se observa el resultado de este ajuste de lsm, y en la tabla 8-14 el resultado del análisis de Tukey.

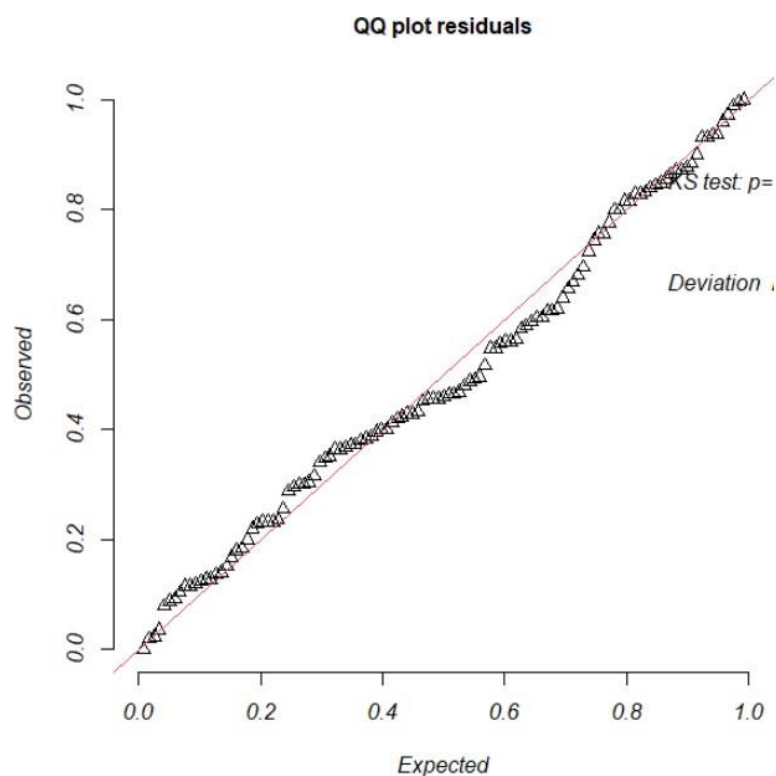


Figura 8-3. QQplot resultante del análisis de residuales obtenidos del ANOVA realizado con los datos de las AUDPC de todas las cepas del experimento 2.

Tabla 8-11. Resultado del ajuste de lsm por cepa y método de los valores de AUDPC del experimento 2.

	Cepa	Método	lsmean	SE	df	lower.CL	upper.CL
1	1001	Asperjado	5,807868	7,573377	99	-9,21936	20,83509
2	1009	Asperjado	44,14992	3,654054	99	36,89948	51,40035
3	1023	Asperjado	29,52502	3,654054	99	22,27459	36,77546
4	1050	Asperjado	13,88799	3,886394	99	6,176543	21,59944
5	1001	Tallo	16,42569	3,654054	99	9,175249	23,67612
6	1009	Tallo	76,1619	4,081464	99	68,06339	84,26041
7	1023	Tallo	39,6334	3,865996	99	31,96243	47,30437
8	1050	Tallo	45,0498	3,654054	99	37,79937	52,30024
9	1001	Tijeras	14,16001	4,379635	99	5,469859	22,85015
10	1009	Tijeras	41,75025	3,654054	99	34,49981	49,00069
11	1023	Tijeras	56,67518	3,654054	99	49,42474	63,92561
12	1050	Tijeras	50,70016	3,654054	99	43,44972	57,9506

Tabla 8-12. Resultado del análisis de Tukey de los valores de lsm de las cepas MAI 1001, MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050 para evaluar en cada cepa la diferencia entre sí misma según el método de inoculación utilizado, experimento 2.

	Contrast	estimate	SE	df	t.ratio	p.value
1	1001 Asperjado - 1009 Asperjado	-42,625	4,932888	103	-8,64099	5,14E-12
2	1001 Asperjado - 1023 Asperjado	-28	4,932888	103	-5,67618	8,14E-06
3	1001 Asperjado - 1050 Asperjado	-11,775	4,932888	103	-2,38704	0,424189
4	1001 Asperjado - 1001 Tallo	-14,9	4,932888	103	-3,02054	0,117597
5	1001 Asperjado - 1009 Tallo	-74,6799	5,240564	103	-14,2504	0
6	1001 Asperjado - 1023 Tallo	-38,1394	5,084358	103	-7,50132	1,52E-09
7	1001 Asperjado - 1050 Tallo	-43,525	4,932888	103	-8,82343	2,1E-12
8	1001 Asperjado - 1001 Tijeras	-8,40001	4,932888	103	-1,70286	0,862851
9	1001 Asperjado - 1009 Tijeras	-40,225	4,932888	103	-8,15445	5,89E-11
10	1001 Asperjado - 1023 Tijeras	-55,15	4,932888	103	-11,1801	4,54E-14
11	1001 Asperjado - 1050 Tijeras	-49,175	4,932888	103	-9,96881	1,02E-13
12	1009 Asperjado - 1023 Asperjado	14,62506	4,932888	103	2,964806	0,134541
13	1009 Asperjado - 1050 Asperjado	30,85002	4,932888	103	6,253947	5,97E-07
14	1009 Asperjado - 1001 Tallo	27,72502	4,932888	103	5,620444	1,04E-05
15	1009 Asperjado - 1009 Tallo	-32,0549	5,240564	103	-6,11669	1,12E-06
16	1009 Asperjado - 1023 Tallo	4,485612	5,084358	103	0,882238	0,999165
17	1009 Asperjado - 1050 Tallo	-0,89996	4,932888	103	-0,18244	1
18	1009 Asperjado - 1001 Tijeras	34,22502	4,932888	103	6,93813	2,36E-08
19	1009 Asperjado - 1009 Tijeras	2,400028	4,932888	103	0,486536	0,999998
20	1009 Asperjado - 1023 Tijeras	-12,525	4,932888	103	-2,53908	0,328419
21	1009 Asperjado - 1050 Tijeras	-6,54999	4,932888	103	-1,32782	0,973487
22	1023 Asperjado - 1050 Asperjado	16,22497	4,932888	103	3,289141	0,058356
23	1023 Asperjado - 1001 Tallo	13,09997	4,932888	103	2,655638	0,263737
24	1023 Asperjado - 1009 Tallo	-46,6799	5,240564	103	-8,90743	1,41E-12
25	1023 Asperjado - 1023 Tallo	-10,1394	5,084358	103	-1,99424	0,696154
26	1023 Asperjado - 1050 Tallo	-15,525	4,932888	103	-3,14725	0,085386
27	1023 Asperjado - 1001 Tijeras	19,59996	4,932888	103	3,973324	0,006988
28	1023 Asperjado - 1009 Tijeras	-12,225	4,932888	103	-2,47827	0,365334
29	1023 Asperjado - 1023 Tijeras	-27,1501	4,932888	103	-5,50389	1,73E-05
30	1023 Asperjado - 1050 Tijeras	-21,175	4,932888	103	-4,29263	0,00226
31	1050 Asperjado - 1001 Tallo	-3,125	4,932888	103	-0,6335	0,999967
32	1050 Asperjado - 1009 Tallo	-62,9049	5,240564	103	-12,0035	6,99E-15
33	1050 Asperjado - 1023 Tallo	-26,3644	5,084358	103	-5,1854	6,72E-05
34	1050 Asperjado - 1050 Tallo	-31,75	4,932888	103	-6,43639	2,56E-07
35	1050 Asperjado - 1001 Tijeras	3,374998	4,932888	103	0,684183	0,999928
36	1050 Asperjado - 1009 Tijeras	-28,45	4,932888	103	-5,76741	5,43E-06

37	1050 Asperjado - 1023 Tijeras	-43,375	4,932888	103	-8,79303	2,44E-12
38	1050 Asperjado - 1050 Tijeras	-37,4	4,932888	103	-7,58177	1,02E-09
39	1001 Tallo - 1009 Tallo	-59,7799	5,240564	103	-11,4072	3,14E-14
40	1001 Tallo - 1023 Tallo	-23,2394	5,084358	103	-4,57077	0,000797
41	1001 Tallo - 1050 Tallo	-28,625	4,932888	103	-5,80289	4,64E-06
42	1001 Tallo - 1001 Tijeras	6,499998	4,932888	103	1,317686	0,97496
43	1001 Tallo - 1009 Tijeras	-25,325	4,932888	103	-5,13391	8,34E-05
44	1001 Tallo - 1023 Tijeras	-40,25	4,932888	103	-8,15952	5,74E-11
45	1001 Tallo - 1050 Tijeras	-34,275	4,932888	103	-6,94826	2,25E-08
46	1009 Tallo - 1023 Tallo	36,5405	5,364364	103	6,811712	4,33E-08
47	1009 Tallo - 1050 Tallo	31,15493	5,240564	103	5,944957	2,45E-06
48	1009 Tallo - 1001 Tijeras	66,27991	5,240564	103	12,64748	0
49	1009 Tallo - 1009 Tijeras	34,45492	5,240564	103	6,574658	1,34E-07
50	1009 Tallo - 1023 Tijeras	19,52989	5,240564	103	3,726677	0,015795
51	1009 Tallo - 1050 Tijeras	25,5049	5,240564	103	4,866824	0,000249
52	1023 Tallo - 1050 Tallo	-5,38558	5,084358	103	-1,05924	0,995703
53	1023 Tallo - 1001 Tijeras	29,73941	5,084358	103	5,849196	3,77E-06
54	1023 Tallo - 1009 Tijeras	-2,08558	5,084358	103	-0,4102	1
55	1023 Tallo - 1023 Tijeras	-17,0106	5,084358	103	-3,34567	0,049834
56	1023 Tallo - 1050 Tijeras	-11,0356	5,084358	103	-2,1705	0,574343
57	1050 Tallo - 1001 Tijeras	35,12498	4,932888	103	7,120571	9,78E-09
58	1050 Tallo - 1009 Tijeras	3,299992	4,932888	103	0,668978	0,999942
59	1050 Tallo - 1023 Tijeras	-11,625	4,932888	103	-2,35664	0,44458
60	1050 Tallo - 1050 Tijeras	-5,65003	4,932888	103	-1,14538	0,991696
61	1001 Tijeras - 1009 Tijeras	-31,825	4,932888	103	-6,45159	2,38E-07
62	1001 Tijeras - 1023 Tijeras	-46,75	4,932888	103	-9,47721	1,71E-13
63	1001 Tijeras - 1050 Tijeras	-40,775	4,932888	103	-8,26595	3,37E-11
64	1009 Tijeras - 1023 Tijeras	-14,925	4,932888	103	-3,02562	0,116143
65	1009 Tijeras - 1050 Tijeras	-8,95002	4,932888	103	-1,81436	0,80641
66	1023 Tijeras - 1050 Tijeras	5,975009	4,932888	103	1,21126	0,986937

Tabla 8-13. Resultado del ajuste de medias de las cepas por lsm para evaluar la diferencia entre ellas según los métodos de inoculación utilizados, experimento 2.

	Cepa	Metodo	lsmn	SE	df	lower.CL	upper.CL
1	1001	Asperjado	1,524998	3,547671	103	-5,51097	8,560966
2	1009	Asperjado	44,15002	3,547671	103	37,11405	51,18599
3	1023	Asperjado	29,52497	3,547671	103	22,489	36,56093
4	1050	Asperjado	13,3	3,547671	103	6,264033	20,33597
5	1001	Tallo	16,425	3,547671	103	9,389032	23,46097
6	1009	Tallo	76,20491	3,964353	103	68,34255	84,06727
7	1023	Tallo	39,66441	3,755434	103	32,21639	47,11243
8	1050	Tallo	45,04998	3,547671	103	38,01402	52,08595
9	1001	Tijeras	9,925003	3,547671	103	2,889035	16,96097
10	1009	Tijeras	41,74999	3,547671	103	34,71402	48,78596
11	1023	Tijeras	56,67502	3,547671	103	49,63905	63,71099
12	1050	Tijeras	50,70001	3,547671	103	43,66404	57,73598

Tabla 8-14. Resultado del Tukey comparando las lsm de las cepas MAI 1001, MAI 1009, MAI 1023 y MAI 1050 a modo de comparar la diferencia de virulencia entre ellas para cada método de inoculación utilizado, experimento 2.

	contrast	Metodo	Estimate	SE	df	t.ratio	p.value
1	1001 - 1009	Asperjado	-42,625	4,932888	103	-8,64099	4,88E-13
2	1001 - 1023		-28	4,932888	103	-5,67618	7,6E-07
3	1001 - 1050		-11,775	4,932888	103	-2,38704	0,085972
4	1009 - 1023		14,62506	4,932888	103	2,964806	0,019398
5	1009 - 1050		30,85002	4,932888	103	6,253947	5,51E-08
6	1023 - 1050		16,22497	4,932888	103	3,289141	0,007409
7	1001 - 1009	Tallo	-59,7799	5,240564	103	-11,4072	4,11E-15
8	1001 - 1023		-23,2394	5,084358	103	-4,57077	7,92E-05
9	1001 - 1050		-28,625	4,932888	103	-5,80289	4,32E-07
10	1009 - 1023		36,5405	5,364364	103	6,811712	3,97E-09
11	1009 - 1050		31,15493	5,240564	103	5,944957	2,28E-07
12	1023 - 1050		-5,38558	5,084358	103	-1,05924	0,714955
13	1001 - 1009	Tijeras	-31,825	4,932888	103	-6,45159	2,19E-08
14	1001 - 1023		-46,75	4,932888	103	-9,47721	3,36E-14
15	1001 - 1050		-40,775	4,932888	103	-8,26595	3,09E-12
16	1009 - 1023		-14,925	4,932888	103	-3,02562	0,016302
17	1009 - 1050		-8,95002	4,932888	103	-1,81436	0,272522
18	1023 - 1050		5,975009	4,932888	103	1,21126	0,621152

8.4.4. Ensayo de latencia de MAI 1001

En la tabla 8-15 se puede observar el resultado del *test* de ANOVA realizado sobre los valores del recuento(log ufc/g) obtenidos tras el ensayo de latencia de MAI 1001.

Tabla 8-15. Resultado del ANOVA realizado con los valores de log ufc/g obtenidos por el recuento de MAI 1001.

Response: AUDPC

	df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr (>F)
Tratamiento	1	8.136	4.068	1.481	0.284
Residuals	8	21.969	2.746		

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Test de homogeneidad de varianza Levene – p-valor: 0,8343

Test de normalidad Shapiro-Wilk – p-valor: 0,8062

8.5. Análisis bioinformático

8.5.1. Curvas de porcentaje GC de las lecturas obtenidas por Nanopore

MAI 1001

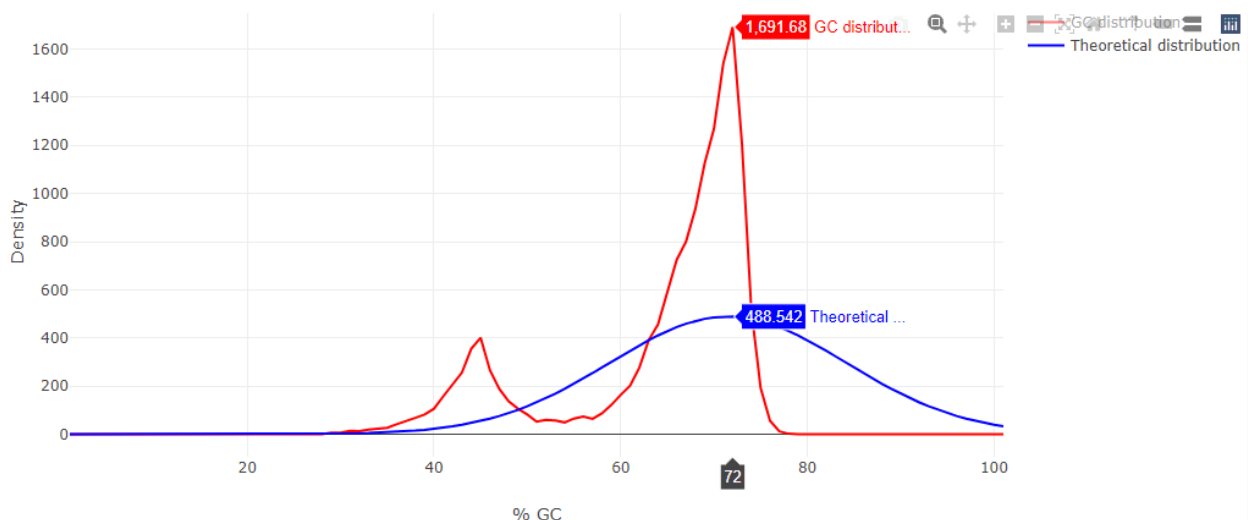


Figura 8-4. Curva de %GC de lecturas obtenidas por Nanopore para la cepa MAI 1001.

MAI 1009

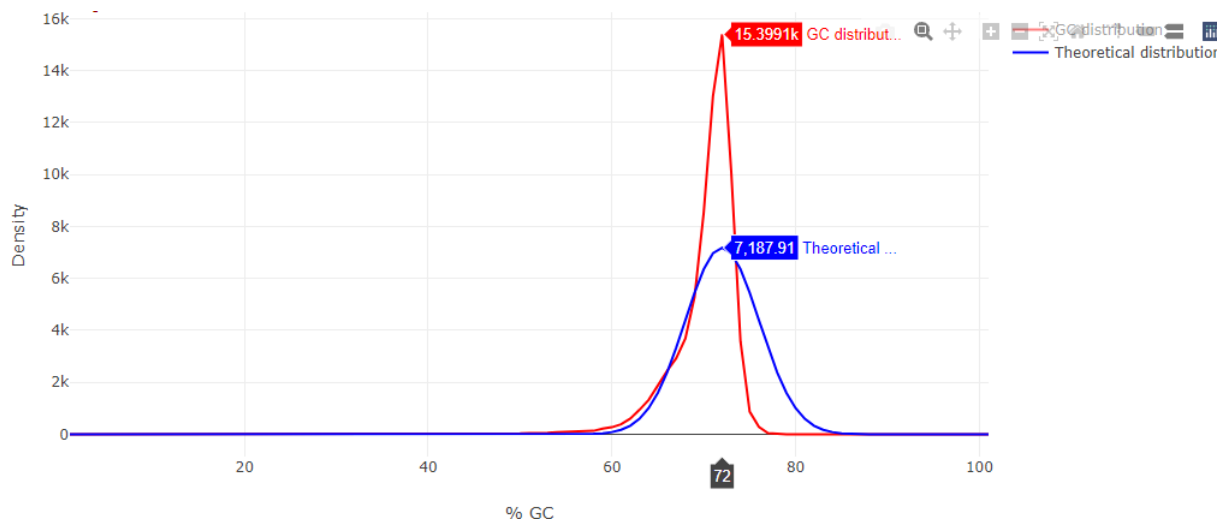


Figura 8-5. Curva de %GC de lecturas obtenidas por Nanopore para la cepa MAI 1009

MAI 1018

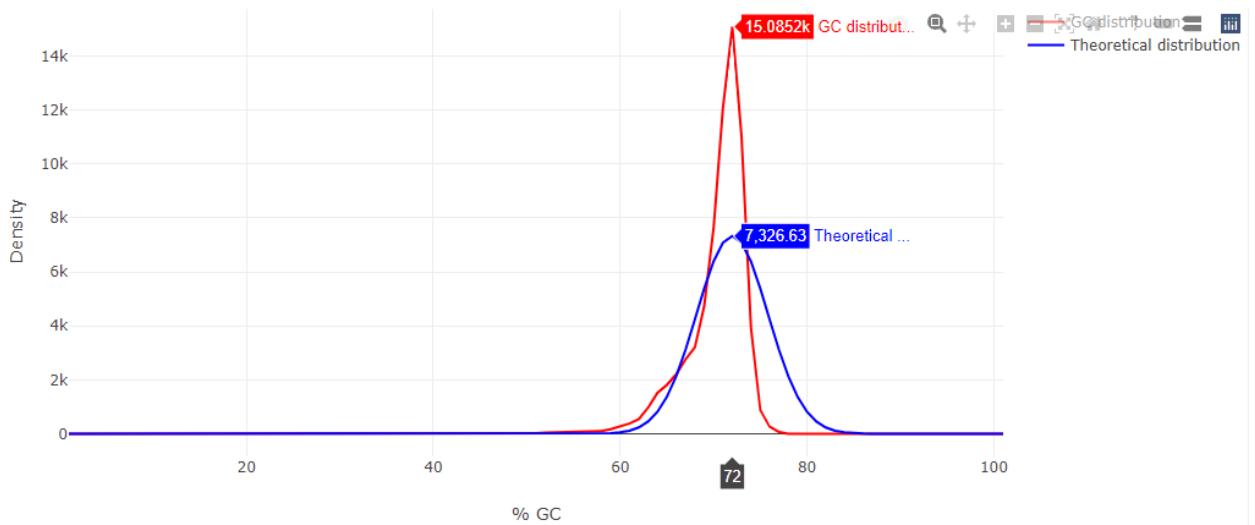


Figura 8-6. Curva de %GC de lecturas obtenidas por Nanopore para la cepa MAI 1018.

MAI 1023

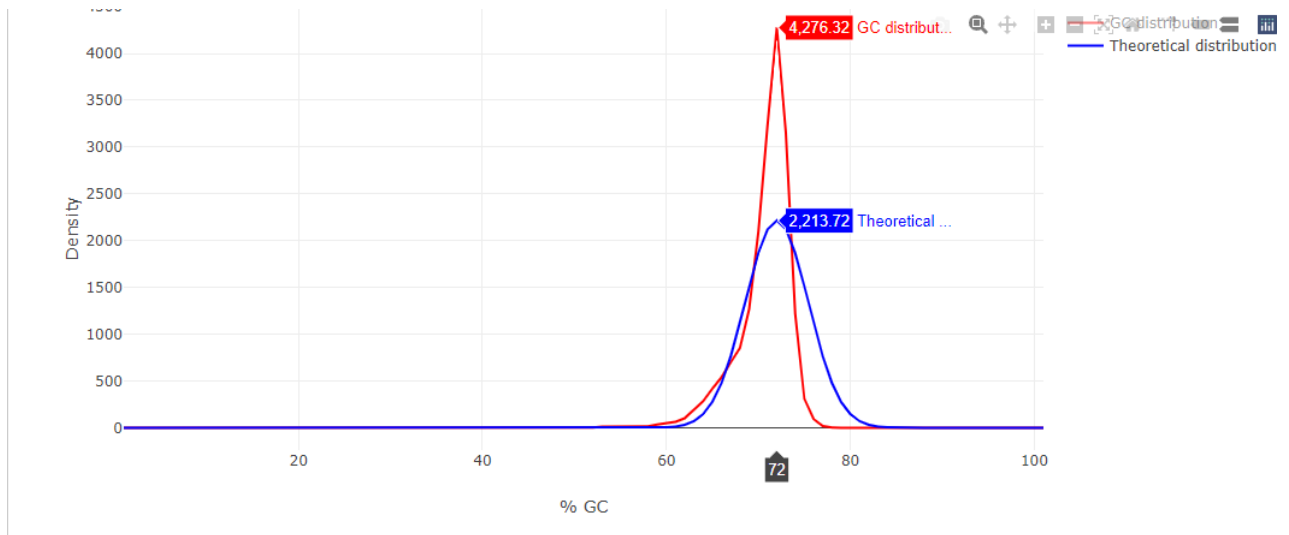


Figura 8-7. Curva de %GC de lecturas obtenidas por Nanopore para la cepa MAI 1023.

MAI 1050

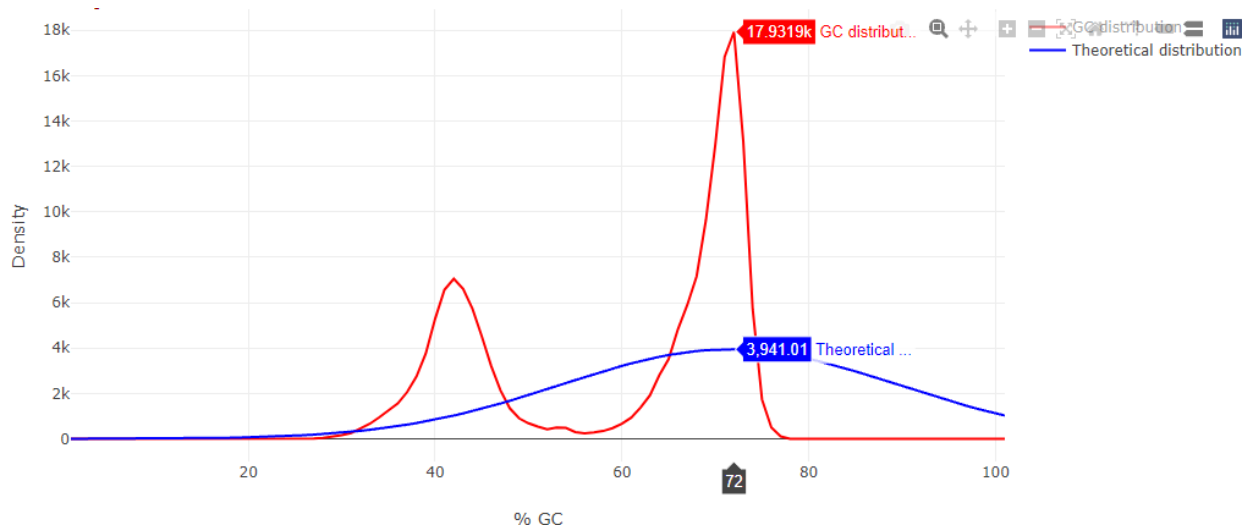


Figura 8-8. Curva de %GC de lecturas obtenidas por Nanopore para la cepa MAI 1050.

8.5.2. Curvas de porcentaje GC de las lecturas obtenidas por Illumina

MAI 1001

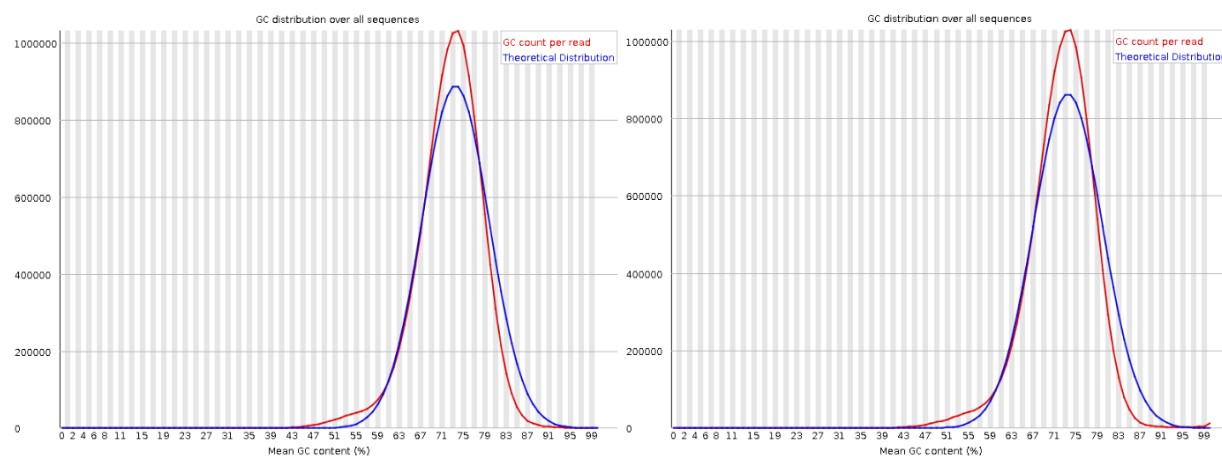


Figura 8-9. Curva de %GC de lecturas obtenidas por Illumina para la cepa MAI 1001. Izquierda: lecturas *forward*, derecha: lecturas *reverse*.

MAI 1009

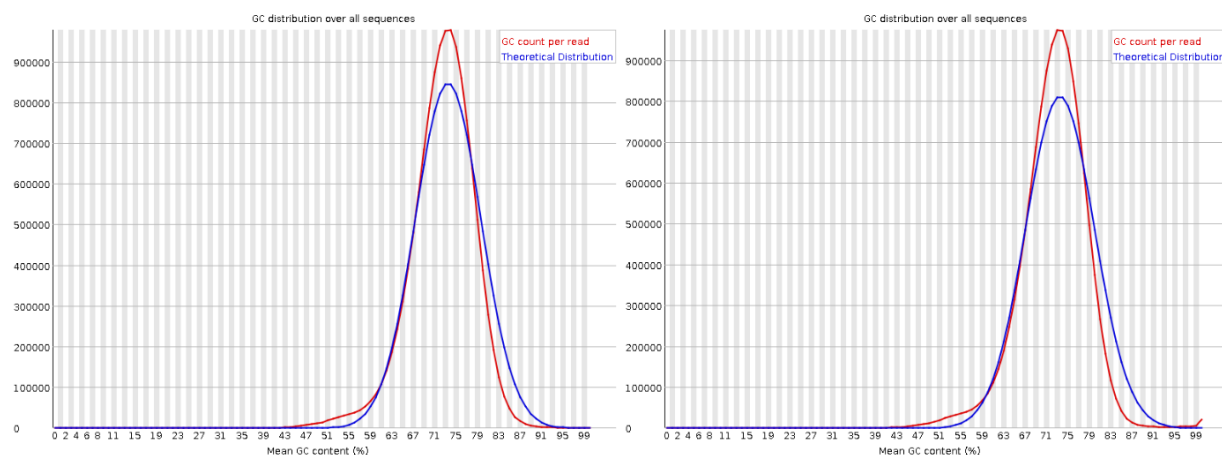


Figura 8-10. Curva de %GC de lecturas obtenidas por Illumina para la cepa MAI 1009. Izquierda: lecturas *forward*, derecha: lecturas *reverse*.

MAI 1018

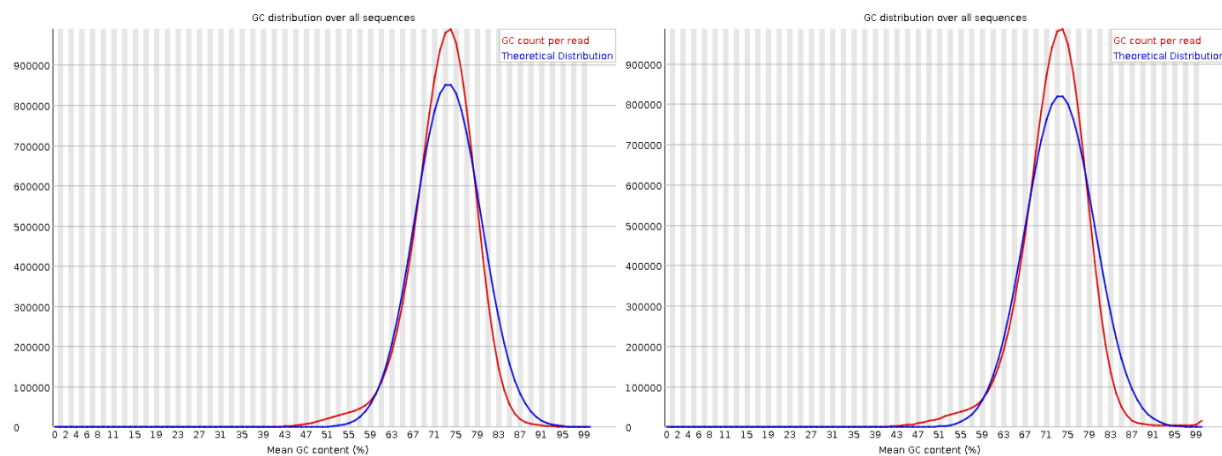


Figura 8-11. Curva de %GC de lecturas obtenidas por Illumina para la cepa MAI 1018. Izquierda: lecturas *forward*, derecha: lecturas *reverse*.

MAI 1023

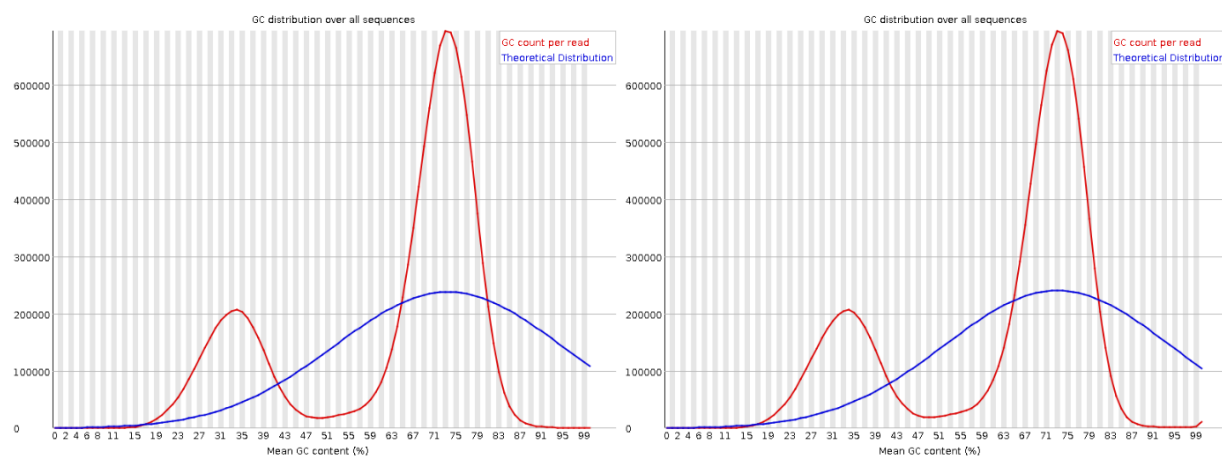


Figura 8-12. Curva de %GC de lecturas obtenidas por Illumina para la cepa MAI 1023. Izquierda: lecturas *forward*, derecha: lecturas *reverse*.

MAI 1050

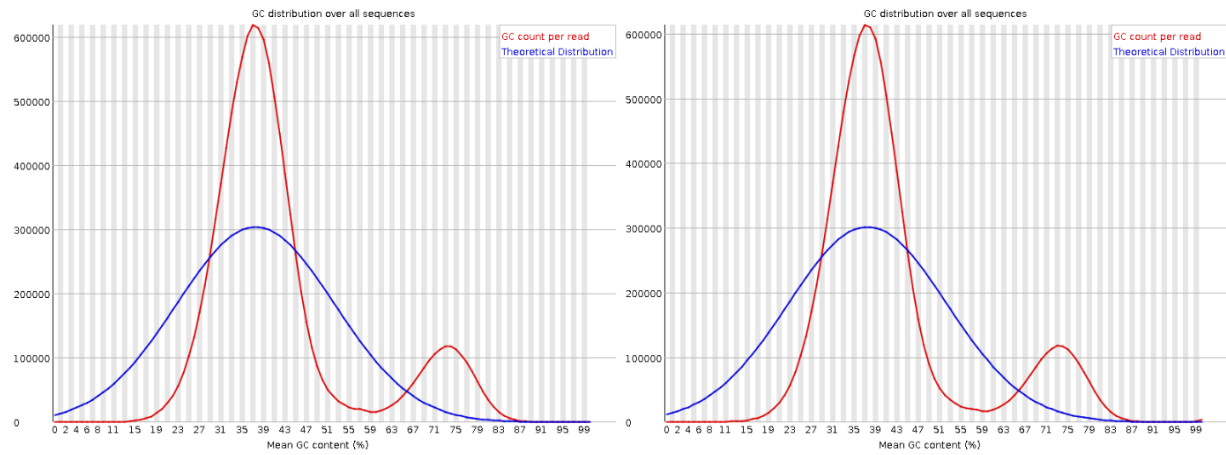


Figura 8-13. Curva de %GC de lecturas obtenidas por Illumina para la cepa MAI 1050. Izquierda: lecturas *forward*, derecha: lecturas *reverse*.