

## Detección de *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* por PCR en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)\*

### Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* by PCR in in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Jesús Frías-Pizano<sup>1</sup>, Gerardo Acosta-García<sup>2</sup>, Katia Fernanda Sánchez-Rico<sup>2</sup>, Mario Martín González-Chavira<sup>3</sup>, Ramón Gerardo Guevara-González<sup>4</sup>, Irineo Torres-Pacheco<sup>4</sup> y Lorenzo Guevara-Olvera<sup>2§</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Roque. Carretera Celaya-Juventino Rosas, km 8, C. P. 38110. Roque municipio de Celaya, Guanajuato. México. (jesus\_frias@yahoo.com). <sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico de Celaya, Av. Tecnológico y A. García Cubas S/N, CP 38010, Celaya, Guanajuato. México. Tel: 01 (461) 6117575 Ext. 5475 y Fax. Ext. 5472. (gerardo.acosta@itcelaya.edu.mx; kfersalinas@hotmail.com; lorenzogo@yahoo.com). <sup>3</sup>Campo Experimental Bajío- INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende, km 6.5. Celaya, Guanajuato. México. (gonzalez.mario@inifap.gob.mx). <sup>4</sup>Facultad de Ingeniería-Universidad Autónoma de Querétaro. C. P. 76010. Santiago de Querétaro, Querétaro, México. (ramon.guevara@uaq.mx; torres.irineo@gmail.com). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: lorenzogo@yahoo.com.

## Resumen

El cáncer bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (*Cmm*), es una enfermedad devastadora del jitomate alrededor del mundo. El objetivo del presente estudio fue describir un procedimiento rápido basado en PCR para la detección de *Cmm* patogénica en plantas de jitomate. El DNA fue aislado por el método de hervido y se realizó PCR para la amplificación del gen *pat-1* (serina proteasa), empleando los oligonucleótidos CMM5F y CMM6R, cuyo tamaño de amplicón fue de 608 pb. El fragmento fue clonado, secuenciado y comparado con la base de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica), mostrando 100% de identidad con secuencias del gen *pat-1* de *Cmm*. Adicionalmente, de la secuencia obtenida se diseñaron 2 pares de oligonucleótidos anidados para producir amplicones de 250 pb a una temperatura de alineamiento de 62 °C. Los resultados descritos en el presente trabajo permitirán la identificación rápida y precisa de *Cmm* por PCR en semilla y en tejido vegetal de jitomate, al reducir el tiempo de análisis de 24 a 4 h aproximadamente.

## Abstract

Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (*Cmm*) is a devastating disease of tomato around the world. The aim of this study was to describe a rapid procedure based on PCR for the detection of pathogenic *Cmm* in tomato plants. The DNA was isolated by boiling method and PCR was performed to amplify *pat-1* gene (serine protease) using the oligonucleotides CMM5F and CMM6R whose amplicon size was 608 bp. The fragment was cloned, sequenced and compared with the database from NCBI (National Center for Biotechnology Information), showing 100% identity with sequences *pat-1* gene of *Cmm*. Additionally, from the sequence obtained two pairs of nested oligonucleotides were designed to produce amplicons of 250 bp to an annealing temperature of 62 °C. The results described in this paper will allow rapid and accurate identification of *Cmm* by PCR in seed and tomato plant tissue by reducing the analysis time from 24 to 4 h approximately.

**Keywords:** *Clavibacter michiganensis* ssp., *michiganensis*, *Lycopersicon esculentum* Mill., bacterial canker, boiled, nested oligonucleotides.

\* Recibido: julio de 2016  
Aceptado: septiembre de 2016

**Palabras clave:** *Clavibacter michiganensis* ssp., *michiganensis*, *Lycopersicon esculentum* Mill., cáncer bacteriano, hervido, oligonucleotidos anidados.

## Introducción

La producción total de jitomate en México es de 2.2 millones de toneladas en una superficie de 96 651 ha, es el primer exportador de tomates en el mundo con 1.4 millones de toneladas y de ventas externas del orden de los 2 038 millones de dólares anuales, genera 72 000 empleos directos y 10.7 millones de empleos indirectos (SIAP, 2013; Flores, 2014). Entre los factores que limitan la producción de este cultivo se encuentran los problemas fitosanitarios, como el cáncer bacteriano que es ocasionado por la bacteria *Clavibacter michiganensis* ssp *michiganensis* (*Cmm*), una enfermedad cuarentenada y de impacto internacional por las pérdidas económicas que ocasiona en la producción de jitomate, principalmente en invernadero. Cuando se presenta es devastadora y con gran capacidad de diseminación, *Cmm* puede sobrevivir en restos de plantas o en el suelo por periodos de 2 ó 3 años, lo cual dificulta su control (Fatmi y Schaad, 2002; Flores, 2014).

*Cmm* está distribuida en todas las zonas donde se cultiva jitomate, se han reportado epidemias en Israel, Japón, España y México, en promedio puede ocasionar pérdidas de 80 a 100% (Borboa-Flores *et al.*, 2009; EPPO, 2010; De León *et al.*, 2011; NAPPO, 2013). Las semillas infectadas constituyen la fuente primaria de inóculo y son responsables de la ocurrencia de brotes severos de la infección. Se requieren bajos niveles de contaminación de semilla para iniciar una epidemia, es difícil el diagnóstico oportuno debido a que cuando inicia la infección los síntomas tardan en presentarse, los primeros indicios del cáncer bacteriano generalmente aparecen entre 30 y 40 días después del trasplante, lo cual dificulta su control. Por lo anterior, es necesario contar con métodos confiables y de alta sensibilidad para realizar un diagnóstico efectivo (Chang *et al.*, 1992; Milijašević *et al.*, 2007; Milijasevic-Marcic *et al.*, 2012). Por otro lado, no se han desarrollado variedades resistentes a este patógeno a pesar de los frecuentes intentos de mejoramiento (Eichenlaub y Gartemann, 2011).

Los métodos empleados para detectar a *Cmm* son la inmunofluorescencia y ELISA (Riley, 1987; Nemeth *et al.*, 1991; Franken *et al.*, 1993; Kaneshiro y Álvarez, 2001), que determinan presencia o ausencia, pero no diagnostican la

## Introduction

The total production of tomatoes in Mexico is 2.2 million tons in an area of 96 651 ha, is the leading exporter of tomatoes in the world with 1.4 million tons and exports in the order of 2038 million dollars a year, it generates 72,000 direct jobs and 10.7 million indirect jobs (SIAP, 2013; Flores, 2014). Among the factors limiting the production of this crop are phytosanitary problems such as bacterial canker that is caused by *Clavibacter michiganensis* ssp *michiganensis* (*Cmm*), a quarantine disease and with international impact by the economic losses in tomato production, mainly in greenhouses. When present it is devastating and with full dissemination, *Cmm* can survive in plant debris or in soil for periods of 2 or 3 years, which hinders its control (Fatmi and Schaad, 2002; Flores, 2014).

*Cmm* is distributed in all areas where tomatoes are grown, there have been epidemics in Israel, Japan, Spain and Mexico on average can cause losses of 80 to 100% (Borboa-Flores *et al.*, 2009; EPPO, 2010; De León *et al.*, 2011; NAPPO, 2013). Infected seeds are the primary source of inoculum and are responsible for the occurrence of serious outbreaks of infection. Low levels of contamination of seed are required to start an epidemic, it is difficult to timely diagnose because when infection begins the symptoms take time to appear, and the first signs of bacterial canker usually appear between 30 and 40 days after transplantation, which makes difficult its control. Therefore, it is necessary to have reliable and highly sensitive methods for effective diagnosis (Chang *et al.*, 1992; Milijašević *et al.*, 2007; Milijasevic-Marcic *et al.*, 2012). On the other hand, there have not been developed resistant varieties to this pathogen despite frequent attempts of improvement (Eichenlaub and Gartemann, 2011).

The methods used to detect *Cmm* are immunofluorescence and ELISA (Riley, 1987; Nemeth *et al.*, 1991; Franken *et al.*, 1993; Kaneshiro and Alvarez, 2001), which determine the presence or absence, but do not diagnose virulence. Other molecular methods of detection include Southern hybridization using probes derived from *CelA* and *pat-1* genes (Dreier *et al.*, 1995) coding for a endocellulase and a serine protease, respectively and from virulence plasmids PCM1 and PCM2 (Dreier *et al.*, 1997); however, such serologic and hybridization procedures have some limitations such as low sensitivity and long waiting times for results.

virulencia. Otros métodos moleculares de detección incluyen hibridación tipo Southern empleando sondas derivadas de los genes *CelA* y *pat-1* (Dreier *et al.*, 1995) que codifican para una endocelulasa y una serina proteasa, respectivamente y de los plásmidos de virulencia pCM1 y pCM2 (Dreier *et al.*, 1997); sin embargo, tales procedimientos serológicos y de hibridación tienen algunas limitantes como la baja sensibilidad y tiempos prolongados de espera de los resultados.

La detección del patógeno en plantas asintomáticas o infectadas al momento del trasplante es complicada, debido a que no se observan los síntomas, esto permite su diseminación y dificulta el control en almacigo, por ello, es necesario optimizar un método confiable y preciso de detección de *Cmm*, en el tejido vegetal e incluso para evitar la diseminación por el uso de semilla infectada. Las técnicas de PCR es sensible y mediante el diseño de oligonucleótidos específicos combinando con procedimientos de extracción rápida del DNA (Holmes y Quigley, 1981; Dellaporta *et al.*, 1983; Acosta-García *et al.*, 2012) puede determinar la identidad y sugerir la virulencia de una bacteria fitopatogena (Dreier *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2007; Rodríguez, 2013), además de evitar falsos positivos y negativos (Dreier *et al.*, 1995; Souza-Santos *et al.*, 1997; Pastrik y Rainey, 1999; Kaneshiro y Álvarez, 2001; Burokiene, 2006).

El objetivo de la presente investigación fue desarrollar un procedimiento de PCR para la identificación rápida y precisa de *Cmm* mediante el diseño de oligonucleótidos específicos anidados y la extracción del DNA por hervido para la amplificación de un fragmento del gen de virulencia *pat-1* (serina proteasa) de 250 pb.

## Materiales y métodos

### Material biológico

La cepa de *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (*Cmm*) aislada de plantas de jitomate tipo Saladette provenientes de Zamora Michoacán, fue proporcionada por el laboratorio de fitobacteriología del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Montecillo, Estado de México. La cepa *Cmm* fue mantenida en placas de medio selectivo YDC (Extracto de levadura, dextrosa, CaCO<sub>3</sub> y agar) y propagada en medio líquido LB (Luria-Bertani) incubando durante 48 h a 28 °C. Las plantas de *Lycopersicon esculentum* Mill tipo Saladette con síntomas y

Pathogen detection in asymptomatic or infected plants when transplanting is difficult, because the symptoms are not observed, this allows its spread and makes hard to control it in seedbed, therefore, it is necessary to optimize a reliable and accurate detection method of *Cmm*, in plant tissue and even to prevent the spread by the use of infected seed. PCR is sensitive and by designing specific oligonucleotides combined with rapid extraction procedures of DNA (Holmes and Quigley, 1981; Dellaporta *et al.*, 1983; Acosta-García *et al.*, 2012) can determine the identity and suggest the virulence of phytopathogenic bacteria (Dreier *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2007; Rodríguez, 2013), and avoid false positives and negatives (Dreier *et al.*, 1995; Souza-Santos *et al.*, 1997; Pastrik and Rainey, 1999; Kaneshiro and Alvarez, 2001; Burokiene, 2006).

The objective of this research was to develop a PCR procedure for rapid and accurate identification of *Cmm* by designing specific nested oligonucleotides and DNA extraction by boiling for amplification of a fragment from virulence *pat-1* gene (serine protease) 250 bp.

## Materials and methods

### Biological material

The isolated strain of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (*Cmm*) of Saladette tomato plants from Zamora Michoacán was provided by the phyto-bacterology lab from the Graduate College Campus Montecillo Montecillo, State of Mexico. The *Cmm* strain was kept on YDC selective medium (yeast extract, dextrose, CaCO<sub>3</sub> and agar) and propagated in LB liquid medium (Luria-Bertani) incubated for 48 h at 28 °C. *Lycopersicon esculentum* Mill plants Saladette type with symptoms and asymptomatic to *Cmm*, were collected in an open field in the locality "La Rinconada" de Zamora, Michoacán during the spring-summer 2013. For transformation chemically competent cells of *Escherichia coli* were used (Invitrogen™) TOP 10 F'. Plasmid TOPO TA 4 (Invitrogen™) was used for cloning the PCR product. Restriction enzyme *Eco* RI was used to release the cloned PCR products.

### DNA extraction

To obtain DNA from *Cmm* the boiling method (Holmes and Quigley, 1981) was used. 1.5 mL Eppendorf tubes were prepared, 100 mg of glass beads of 450-600 µm and 150 of TE µL (Tris base, 50 mM EDTA, 2 mM) were added.

asintomáticas a *Cmm*, fueron colectadas en campo abierto en la localidad "La Rinconada" de Zamora, Michoacán durante el ciclo primavera-verano de 2013. Para la transformación se emplearon células químicamente competentes de *Escherichia coli* (Invitrogen™) TOP 10 F'. El plásmido TOPO TA 4 (Invitrogen™) fue empleado para la clonación del producto de PCR. La enzima de restricción *Eco* RI fue empleada para la liberación de los productos de PCR clonados.

### Extracción de DNA

Para la obtención del DNA de *Cmm* se empleó el método de hervido (Holmes y Quigley, 1981). Se prepararon tubos Eppendorf de 1.5 mL se colocaron 100 mg de perlas de vidrio de 450-600  $\mu\text{m}$  y 150  $\mu\text{L}$  de TE (Tris base, 50 mM; EDTA, 2 mM). Se transfirieron de 2-4 mg de bacterias a partir de placas sólidas con asa metálica, en tanto de material vegetal foliar con síntomas y asintomáticos fueron transferidos de 80-100 mg a cada tubo, en todos los casos se agitaron con vortex durante 2 min. Los tubos se sellaron con papel parafilm, se hirvieron durante 5 min a temperatura de 100 °C y se mezclaron por agitación durante 1 min. A cada tubo se le adicionaron 150  $\mu\text{L}$  de una mezcla fenol: cloroformo (1:1, v:v), se agitó con la ayuda de un vortex por 1 min y se centrifugó a temperatura ambiente a 12 000 rpm durante 5 min. Se transfirió el sobrenadante de cada muestra a un nuevo tubo Eppendorf estéril, se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo, se sometió a vortex por 1 min y se centrifugó como en el paso anterior. De cada sobrenadante se empleó 1  $\mu\text{L}$  como templado para la reacción de PCR. Como control, se realizó la extracción de DNA por el método de Dellapota (Dellaporta *et al.*, 1983) recomendado para plantas. El aislamiento del DNA se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con con GelRed™ (Biotum).

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de un fragmento del gen *pat-1* (serina proteasa) de *Cmm* se llevó a cabo por PCR utilizando los oligonucleótidos: CMM5F y CMM6R (Dreier *et al.*, 1995; Cuadro 1) y como templado los DNA obtenidos por el método de hervido (Holmes y Quigley, 1981). Los componentes de la mezcla de reacción fueron: 17.4  $\mu\text{L}$  de agua, 2.5  $\mu\text{L}$  de reg taq 10 X, 1.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  de oligonucleótidos sentido y antisentido, 0.5  $\mu\text{L}$  dNTPs, 0.1  $\mu\text{L}$  Taq y 1.0  $\mu\text{L}$  de DNA templado para un volumen total de reacción de 25  $\mu\text{L}$ . Las condiciones del termociclador GeneAmp PCR System 2400 Perkin fueron: Desnaturalización 94 °C, 3 min, más 35 ciclos con las siguientes temperaturas y tiempos: 94 °C, 30 s;

Then transferred 2-4 mg of bacteria from solid plates with metal handle, in both plant material with symptoms and asymptomatic were transferred from 80-100 mg to each tube, in all cases were agitated with a vortex for 2 min. The tubes were sealed with parafilm, boiled for 5 min at 100 °C and mixed by stirring for 1 min. To each tube were added 150  $\mu\text{L}$  of a phenol: chloroform (1:1, v: v) mixture, stirred with the aid of a vortex for 1 min and centrifuged at room temperature at 12 000 rpm for 5 min. The supernatant of each sample was transferred to a new sterile Eppendorf tube, adding 100  $\mu\text{L}$  of chloroform, vortexed for 1 min and centrifuged as in the previous step. 1  $\mu\text{L}$  of each supernatant was used as temperate for PCR reaction. As control, DNA extraction was performed by the Dellapota method (Dellaporta *et al.*, 1983) recommended for plants. DNA isolation was verified by electrophoresis in agarose gel at 1.2% stained with GelRed™ (Biotum).

### Polymerase chain reaction (PCR)

Amplification of a fragment form *pat-1* gene (serine protease) of *Cmm* was performed by PCR using the oligonucleotides: CMM5F and CMM6R (Dreier *et al.*, 1995; Table 1); and as temperate the DNA obtained by the boiling method (Holmes and Quigley, 1981). The components of the reaction mixture were: 17.4  $\mu\text{L}$  of water, 2.5  $\mu\text{L}$  of reg taq 10 X, 1.5  $\mu\text{L}$  of  $\text{MgCl}_2$ , 1  $\mu\text{L}$  of sense and antisense oligonucleotides, 0.5  $\mu\text{L}$  dNTPs, 0.1  $\mu\text{L}$  Taq and 1.0  $\mu\text{L}$  of temperate DNA for total reaction volume 25  $\mu\text{L}$ . Thermocycler GeneAmp PCR System 2400 Perkin conditions were: Denaturation 94 °C, 3 min, plus 35 cycles with the following temperatures and times: 94 °C, 30 s; alignment 55 °C, 1 min; synthesis 72 °C, 1 min and finally 1 additional cycle at 72 °C, 5 min, to obtain 250 bp amplicons a temperature annealing of 62 °C, for 30 s and synthesis 72 °C, 30 s (Table 1) were used. Amplification of PCR products were verified by electrophoresis on agarose gel 1.2% stained with GelRed™ (Biotum), the molecular size marker GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Life Technologies) was used and the image was recorded on a transilluminator Vilber Lourmat (Marne-La-Vallee Cedex, France).

### Cloning, sequencing and comparison

The PCR product was isolated and cloned into the vector pCR4-TOPO®TA, colonies for plasmid DNA extraction were selected and digestion with *Eco* RI enzyme to verify the presence of the insert. Plasmid DNA purification of 2 clones was performed using QIAprep Spin Miniprep Kit Qiagen columns to obtain DNA-in quantity and quality for sequencing. Thus, the  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  index was determined



alineamiento 55 °C, 1 min; síntesis 72 °C, 1 min y finalmente 1 ciclo adicional a 72 °C, 5 min, en tanto para la obtención de amplicones de 250 pb se empleó una temperatura de alineamiento de 62 °C, durante 30 s y síntesis 72 °C, 30 s (Cuadro 1). Se verificó la amplificación de los productos de PCR por electroforesis en gel de agarosa al 1.2% teñido con GelRed™ (Biotum), se empleó el marcador de tamaño molecular GeneRuler 1 kb DNALadder (Life Technologies) y la imagen fue registrada en un transiluminador Vilber Lourmat (Marne-La-Valée Cedex, France).

### Clonación, secuenciación y comparación

El producto de PCR fue aislado y clonado en el vector pCR4-TOPO® TA, se seleccionaron las colonias para extracción de DNA plasmídico y la digestión con la enzima *Eco* RI para verificar la presencia del inserto. Se realizó la purificación de DNA plasmídico de 2 clonas empleando columnas QIAprep Spin Miniprep Kit-Qiagen para obtener DNA en cantidad y calidad para secuenciar. Así, el índice  $A_{260nm}/A_{280nm}$  se determinó empleando el espectofotometro Thermo Scientific™ NanoDrop 2000/200c, el cual fue cercano a 2.0. La secuencia de oligonucleótidos fue determinada empleando el secuenciador automático ABI PRISM 310 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). La comparación con la base de datos fue realizada empleando el algoritmo Blastx (Altschul *et al.*, 1990) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

### Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los 2 pares de oligonucleótidos anidados, temperatura de fusión (Tm) y tamaño del amplicón de 250 pb del gen *pat-1* (serina proteasa) de *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, se empleó el algoritmo OligoPerfect™ Designer de Invitrogen (Cuadro 1).

using the spectrophotometer Thermo Scientific™ NanoDrop 2000/200c, which was close to 2.0. The oligonucleotide sequence was determined using the ABI PRISM 310 automated sequencer (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Comparison with the database was performed using the BLASTX algorithm (Altschul *et al.*, 1990) from the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

### Oligonucleotide Design

For the design of the 2 nested oligonucleotides pairs, melting temperature (Tm) and amplicon size 250 bp from *pat-1* gene (serine protease) of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, the algorithm OligoPerfect™ Designer from Invitrogen (Table 1) was used.

## Results

### Isolation of DNA *Cmm*

For identification of the virulent strain of *Cmm*, DNA extraction by boiling (Holmes and Quigley, 1981) and Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1983) methods were used. The result is shown in Figure 1, where a discrete and upper band in size to 10 000 bp corresponding to the genomic DNA of *Cmm* can be observed. The DNA obtained by the boiling method showed significant contamination by mRNA (lines 1 and 2), which is absent in the isolated DNA samples by the Dellaporta method (lines 3 and 4), on the other hand, the  $A_{260nm}/A_{280nm}$  index for isolated plant DNA by the boiling method was 1.71, while for DNA isolated by Dellaporta method (Dellaporta *et al.*, 1989) was 1.93. Additionally, the DNA isolated by the boiling method showed a concentration of 0.595 µg µL,

### Cuadro 1. Oligonucleótidos empleados en el presente trabajo.

Table 1. Oligonucleotides used in this work.

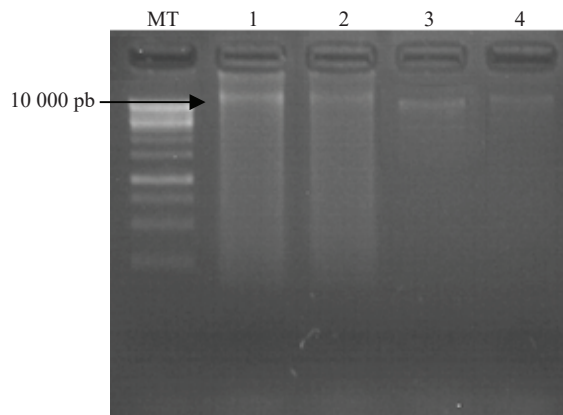
Iniciadores	Secuencia	Número	Tm
CMM5F	5'GCGAATAAGCCCATATCAA3'	19	55 °C (Dreier <i>et al.</i> , 1995)
CMM6R	5'CGTCAGGAGGTCGCTAATA3'	19	55 °C (Dreier <i>et al.</i> , 1995)
HCMA1S	5'GCATTGCGGCGGTCGTGGTG3'	20	62 °C (Presente estudio)
HCMB1As	5'TCCGGCTACCGGCACGGATG3'	20	62 °C (Presente estudio)
HCMC2S	5'CGAAGCATTGCGGCGGTCGTG3'	21	62 °C (Presente estudio)
HCMD2As	5'TCCGGCTACCGGCACGGATGA3'	21	62 °C (Presente estudio)

## Resultados

### Aislamiento del DNA de *Cmm*

Para la identificación de la cepa virulenta de *Cmm* se emplearon los métodos de extracción del DNA por hervido (Holmes y Quigley, 1981) y Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1983). El resultado es mostrado en la Figura 1, en donde se observa una banda discreta y superior en tamaño a 10 000 pb correspondiente al DNA genómico de *Cmm*. El DNA obtenido por el método de hervido mostró considerable contaminación por RNAm (líneas 1 y 2), la cual se encuentra ausente en las muestras de DNA aislado por el método Dellaporta (líneas 3 y 4), por otro lado, el índice  $A_{260nm}/A_{280nm}$  para el DNA aislado de la planta por el método de hervido fue de 1.71, en tanto para el DNA aislado por el método Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1989) fue de 1.93. Adicionalmente, el DNA aislado por el método de hervido mostró una concentración de  $0.595 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ , en tanto la obtenida por el método Dellaporta fue de  $0.117 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  (Cuadro 2), sugiriendo que las muestras obtenidas por ambos métodos pueden ser empleadas como templado para realizar las reacciones de PCR.

as for the obtained by the Dellaporta method was  $0.117 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$  (Table 2), suggesting that samples obtained by both methods can be used as template for PCR reactions.



**Figura 1.** Extracción de DNA de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* (*Cmm*). Líneas: MT, marcador de tamaño; 1 y 2, DNA obtenido por el método de hervido; 3 y 4, DNA obtenido por el método Dellaporta.

**Figure 1.** DNA extraction of *Clavibacter michiganensis* ssp *michiganensis* (*Cmm*). Lines: MT, size marker; 1 and 2, DNA obtained by the boiling method; 3 and 4, DNA obtained by the Dellaporta method.

### Cuadro 2. Datos comparativos de 2 métodos de extracción de DNA genómico para *Cmm* y planta de jitomate.

**Table 2.** Comparative data of 2 methods for genomic DNA extraction for *Cmm* and tomato plant.

Método de extracción para <i>Cmm</i>	Tiempo	Material de partida (mg) <sup>a</sup>	Concentración de DNA ( $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	Pureza <sup>d</sup>
Dellaporta	19 h	4 (0.778)	0.125 (0.051)	1.91
Hervido	30 min	3 (0.408)	0.576 (0.115)	1.68
Método de extracción para planta de jitomate	Tiempo	Material de partida (mg)	Concentración de DNA ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Pureza
Dellaporta	19 h	90 (14.14)	0.117 (0.058)	1.93
Hervido	30 min	88 (17.79)	0.595 (0.128)	1.71

a= valor medio del material de partida para la extracción del DNA por los métodos de Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1983) y de hervido (Holmes y Quigley, 1981); b= valor medio de la concentración del DNA obtenido; y c= valor medio del índice  $A_{260nm}/A_{280nm}$ . Las desviaciones estándar se muestran en paréntesis. Los experimentos fueron realizados por triplicado.

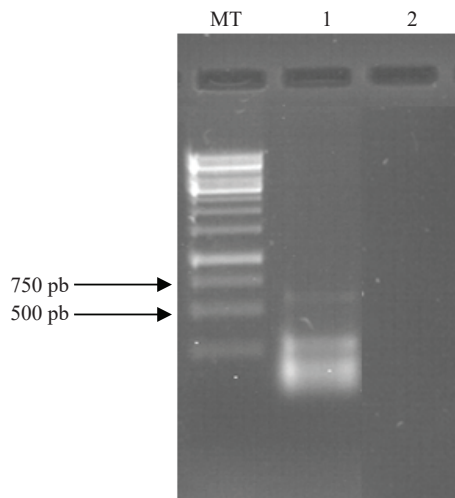
### Amplificación del fragmento del gen *pat-1* de *Cmm*

Para disminuir el tiempo de análisis se emplearon para la reacción de PCR como templado el DNA de *Cmm* obtenido por el método de hervido y los oligonucleótidos publicados CMM5F y CMM6R (Dreier *et al.*, 1995; Cuadro 1). Los productos obtenidos fueron separados en un gel de agarosa al 1.2% teñido con GelRed™ (Figura 2), en donde se observa la amplificación de una banda superior a 500 pb (Línea 1), que pudiera corresponder al fragmento del

### Amplification of fragment *pat-1* gene of *Cmm*

To reduce the time of analysis were used for the PCR reaction as template DNA of *Cmm* obtained by the boiling method and published oligonucleotides CMM5F and CMM6R (Dreier *et al.*, 1995; Table 1). The products obtained were separated on agarose gel 1.2% stained with GelRed™ (Figure 2) showing amplification of a greater band than 500 bp (Line 1), which may correspond to the fragment *pat-1* gene (serine protease), which has a size of 614 bp (Dreier *et*

gen *pat-1* (serina proteasa), la cual posee un tamaño de 614 pb (Dreier *et al.*, 1995). Como control negativo de la reacción de PCR (línea 2), se empleó como templado el DNA obtenido por hervido de planta de jitomate sana y los oligonuclótidos CMM5F y CMM6R.



**Figura 2. Amplificación por PCR de un fragmento del gen *pat-1* de *Cmm*.** Líneas: MT, marcador de tamaño; 1) fragmento amplificado empleando como templado el DNA de *Cmm*; y 2) control negativo empleando como templado el DNA de planta de jitomate asintomática.

**Figure 2. PCR amplification of a fragment of the *pat-1* gene *Cmm*.** Lines: MT, size marker; 1) using amplified fragment as template DNA of *Cmm*; and 2) negative control using as template DNA of asymptomatic tomato plant.

### Identificación de *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (*Cmm*)

Para identificar a la cepa *Cmm* patógena, el fragmento de PCR de aproximadamente 600 pb fue clonado en el vector pCR4-TOPO®TA y transformado en células de *Escherichia coli* químicamente competentes. El DNA plasmídico fue purificado para la obtención de la secuencia, la cual es mostrada en la Figura 3, en donde se señalan el oligonucleótido CMM5F y el complemento del oligonucleótido CMM6R, sugiriendo que un fragmento de 608 pb del gen *pat-1* (serina proteasa) de *Cmm* ha sido clonado. La secuencia obtenida fue comparada con la base de datos del Centro Nacional de Información en Biotecnología (National Center of Biotechnology Information NCBI) empleando el algoritmo Blastx (Altschul *et al.*, 1990) que traduce la secuencia y la compara con las proteínas registradas, el resultado se muestra en el Cuadro 3, en donde se observan secuencias de algunas proteínas de las cepas con los respectivos números

*al.*, 1995). As negative control of PCR reaction (line 2), it was used as the template DNA obtained by boiling from healthy tomato plant and CMM5F and CMM6R oligonucleotides.

### Identification of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (*Cmm*)

To identify the pathogenic strain *Cmm*, the PCR fragment of approximately 600 bp was cloned into the pCR4-TOPO®TA vector and transformed into *Escherichia coli* cells chemically competent. Plasmid DNA was purified to obtain the sequence, which is shown in Figure 3 where points out the CMM5F oligonucleotide and complement oligonucleotide CMM6R, suggesting that a fragment of 608 bp from *pat-1* gene (serine protease) of *Cmm* has been cloned. The sequence obtained was compared with the database from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the BLASTX algorithm (Altschul *et al.*, 1990) that translates the sequence and compares it to the registered proteins, the result is shown in Table 3, where sequences of some proteins of the strains with the respective access numbers are shown: *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* (WP\_011931204.1), *C. michiganensis* ssp. *michiganensis* NCPPB 382 (CAM98537.1), *C. michiganensis* ssp. *michiganensis* (AEM65933.1), *C. michiganensis* ssp. *michiganensis* (AEM65932.1), among others, whose E value was close to 0.0 with *pat-1* gene (serine protease) from *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*, confirming the identification of pathogenic *Cmm*.

### Nested oligonucleotide design for the production of 250bp amplicons by PCR

Based on the sequence obtained two pairs of nested oligonucleotides to produce 250 bp amplicons were designed with an annealing temperature ( $T_m$  of 62 °C) which were designated arbitrarily HCMA1S-HCMB1As (20-mer) and HCMC2S- HCMD2As (21-mer). DNA isolated by the boiling method from tomato plants with symptoms to pathogenic *Cmm* were employed as template for PCR amplification of a fragment of the *pat-1* gene (serine protease). The result is shown in Figure 4, where the amplification of a specific band of 250 bp with both pairs of nested oligonucleotides (lines 1 and 2) is observed. As a positive control a PCR was performed using as template the DNA of tomato plants with *Cmm* symptoms and CMM5F and CMM6R oligonucleotides, which generated the expected 608 bp fragment. As negative control, were

de acceso: *Clavibacter michiganensis* ssp *michiganensis* (WP\_011931204.1), *C. michiganensis* ssp *michiganensis* NCPPB 382 (CAM98537.1), *C. michiganensis* ssp. *michiganensis* (AEM65933.1), *C. michiganensis* ssp. *michiganensis* (AEM65932.1), entre otras, cuyo valor E fue cercano a 0.0 con el gen *pat-1* (serina proteasa) de *Clavibacter michiganensis* ssp *michiganensis*, confirmando la identificación de *Cmm* patogénica.

used as temperate the DNA isolated from asymptomatic tomato plants to *Cmm* and the pair of nested oligonucleotides HCMA1S-HCMB1As, allowing the development of a rapid and specific PCR procedure, combining DNA extraction by the boiling method (Holmes and Quigley, 1981) and nested oligonucleotides with Tm of 62 °C to produce amplicons of 250 bp from *pat-1* gene (serine protease) for the identification of pathogenic *Cmm*.

1	<u>GCGAATAAGCCCATATCAACGCGCTGTCCGATATGTCGTTACCGCGAAGC</u>	50
51	<u>ATTGCGGCGGTCGTGGTGCGCATGTGCGCGTCGGTGACGTGCAAGTCGGC</u>	100
101	TCGGTCATTTGGGAATCGCCAGACGCCGACCTCTCGATTGTCCGGATCGA	150
151	GCCCTTGCAGACGACCAGAAGAAGTTGTTACCCGACGTCGGCCGGCATAAC	200
201	GCTGTACTCTCGTCAATGACTACGAGCCTCGGGCTAGCGGTGAGGTCTTC	250
251	GCGCAAGGAACCGATCAGGCCAGGAGTCATCCGTGCCGGTAGCCGGAAC	300
301	CAAAGTCCCGGCTAATCGAGAGATTTTCTGCACTAGCGGGGCAATAACCG	350
351	GAATTTTGTGTAATTGGGTATCAGTTCCACCGCCTCGAGGGCTGGAAATA	400
401	GGAAGTCACCAAGTCGTCGCGGAGACCTTTTCGGCTGCAACGAGGCAAGG	450
451	GGACTCAGGGGGGCCCCGTTGTGAGCAGGGACATGAAAATCATCGGTATAA	500
501	TATGCGACGGTGGGTTGCCAGGGTCTGGAGACGATACCTACATGAGCTAC	550
551	CTTCCGATTCTGTGCTTTTCCGCGAGCAACCGTATTACATATTAGCGACC	600
601	<u>TCCTGACG</u>	608

**Figura 3. Secuencia de bases del fragmento de 608 pb del gen *pat-1* (serina proteasa) de *Cmm*.** Las secuencias de los oligonucleótidos CMM5F y la segunda cadena de CMM6R se muestran subrayados.

**Figure 3. Base sequence of 608 bp fragment from *pat-1* gene (serine protease) of *Cmm*.** The sequences of the oligonucleotides CMM5F and the second chain CMM6R are underlined.

**Cuadro 3. Secuencias que mostraron alineamiento significativo (NCBI) con valor E cercano a 0.0.**  
**Table 3. Sequences that showed significant alignment (NCBI) with E value close to 0.0.**

Descripción	Valor E	No. de acceso
Serina proteasa [ <i>C. michiganensis</i> ssp <i>michiganensis</i> ]	1e-126	WP_011931204.1
Serina proteasa [ <i>C. michiganensis</i> ssp <i>michiganensis</i> NCPPB 382]	4e-102	CAM98537.1
Serina proteasa [ <i>C. michiganensis</i> ssp <i>michiganensis</i> ]	4e-75	AEM65933.1
Serina proteasa [ <i>C. michiganensis</i> ssp <i>michiganensis</i> ]	7e-73	AEM65932.1

**Diseño de oligonucleótidos anidados para la producción de amplicones de 250 pb por PCR**

En base a la secuencia obtenida se diseñaron 2 pares de oligonucleótidos anidados para la producción de amplicones de 250 pb, con una temperatura de alineamiento (Tm de 62 °C) los cuales fueron denominados arbitrariamente HCMA1S-HCMB1As (20-mero) y HCMC2S-HCMD2As (21-mero). Los DNA aislados por el método de hervido de plantas de jitomate con síntomas a *Cmm* patogénica fueron empleados como templado para la amplificación

**Discussion**

In the present study a procedure based on PCR to detect *Cmm* in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill) Saladette type was developed. To do this it was proposed to combine DNA extraction by boiling method (Holmes and Quigley, 1981) and the use of oligonucleotides HCMA1S-HCMB1As (20-mer) and HCMC2S-HCMD2As (21-mer) with Tm of 62 °C for amplification of 250 bp fragment from *pat-1* gene (serine protease) of *Cmm*. The extraction



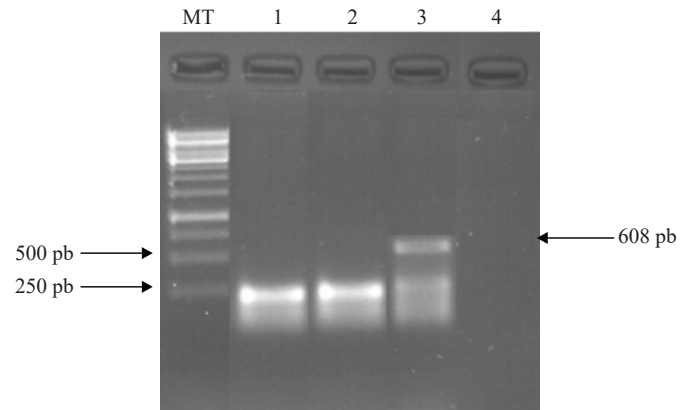
por PCR de un fragmento del gen *pat-1* (serina proteasa). El resultado es mostrado en la Figura 4, en donde se observa la amplificación de una banda específica de tamaño de 250 pb con ambos pares de oligonucleótidos anidados (líneas 1 y 2). Como control positivo se realizó el PCR usando como templado el DNA de plantas de jitomate con síntomas de *Cmm* y los oligonucleótidos CMM5F y CMM6R, el cual generó el fragmento esperado de 608 pb. Como control negativo, se emplearon como templado el DNA aislado de plantas de jitomate asintomáticas a *Cmm* y el par de oligonucleótidos anidados HCMA1S-HCMB1As, permitiendo el desarrollo de un procedimiento de PCR rápido y específico, combinando la extracción del DNA por el método de hervido (Holmes y Quigley, 1981) y los oligonucleótidos anidados con Tm de 62 °C para la producción de amplicones de 250 pb del gen *pat-1* (Serina proteasa) para la identificación de *Cmm* patagénica.

## Discusión

En el presente estudio se desarrolló un procedimiento basado en la técnica de PCR para la detección de *Cmm* en plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) tipo Saladette. Para ello nosotros propusimos el combinar la extracción del DNA por el método de hervido (Holmes y Quigley, 1981) y el uso de los oligonucleótidos HCMA1S-HCMB1As (20-mero) y HCMC2S-HCMD2As (21-mero) con Tm de 62 °C para la amplificación de fragmento de 250 pb del gen *pat-1* (serina proteasa) de *Cmm*. Con el método de extracción por hervido, el cual consume un tiempo de aproximadamente 30 min, el DNA presentó una fracción de RNA (Figura 1): sin embargo, no mostró diferencia con el método Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1983) descrito para plantas, el cual requiere aproximadamente 19 h para completarse.

Debido a que en ambas muestras la banda correspondiente al DNA genómico se presenta en forma discreta de un tamaño superior a las 10 000 pb, con un índice  $A_{260nm}/A_{280nm}$  promedio de 1.70 lo que indica DNA de calidad (Cuadro 2). La concentración del DNA obtenido por el método de hervido fue superior a la obtenida por el método Dellaporta, lo anterior se justifica dado que el espectofotómetro registra la concentración de los ácidos nucleicos, que en este caso incluye al RNA total (Cuadro 2). Para la amplificación por PCR del gen *pat-1* (Serina

proteasa) de *Cmm*, por el método de hervido, el cual consume un tiempo de aproximadamente 30 min, el DNA presentó una fracción de RNA (Figura 1): sin embargo, no mostró diferencia con el método Dellaporta (Dellaporta *et al.*, 1983) descrito para plantas, el cual requiere aproximadamente 19 h to completion.



**Figura 4. Amplificación por PCR de un fragmento de 250 pb del gen *pat-1* de *Cmm* a partir de DNA de plantas con síntomas.** Líneas: MT, marcador de tamaño; 1) oligonucleótidos anidados HCMA1S y HCMB1As; 2) oligonucleótidos anidados HCMC2S y HCMD2As; 3) control positivo, oligonucleótidos CMM5F y CMM6R; y 4) control negativo, DNA de planta de jitomate asintomática como templado y los oligonucleótidos anidados HCMA1S y HCMB1As.

**Figure 4. PCR amplification of a 250 bp fragment from *pat-1* gene of *Cmm* from DNA of plants with symptoms.** Lines: MT, size marker; 1) nested oligonucleotides HCMA1S and HCMB1As; 2) nested oligonucleotides HCMC2S and HCMD2As; 3) positive control, oligonucleotides CMM5F and CMM6R; and 4) negative control, DNA plant from asymptomatic tomato as temperate and nested oligonucleotides HCMA1S and HCMB1As.

Because in both samples the corresponding band to genomic DNA is present in discrete form of a larger size than 10 000 bp, with an average  $A_{260nm}/A_{280nm}$  index of 1.70 indicating DNA quality (Table 2). The DNA concentration obtained by the boiling method was higher than that obtained by Dellaporta method, the above is justified since the spectrophotometer registers the concentration of nucleic acids, which in this case includes total RNA (Table 2). For PCR amplification of *pat-1* gene (Serine protease) of *Cmm*, by using DNA isolated by boiling as temperate and as primers the CMM5F and CMM6R oligonucleotides (Dreier *et al.*, 1995), amplicon obtained was an upper band to 500 pb (Figure 2, line 1), suggesting that corresponds

proteasa) de *Cmm*, al emplearse el DNA aislado por hervido como templado y como iniciadores los oligonucleótidos CMM5F y CMM6R (Dreier *et al.*, 1995), el amplicón obtenido fue una banda superior a 500 pb (Figura 2, línea 1), sugiriendo que corresponde al fragmento del gen *pat-1* (serina proteasa), que ha sido reportado como un tamaño de 614 pb (Dreier *et al.*, 1995), lo cual fue confirmado con la secuenciación del fragmento.

La nula amplificación a partir del DNA obtenido por hervido de planta de jitomate asintomática y los oligonucleótidos CMM5F y CMM6R (Figura 2, línea 2) y HCMA1S-HCMB1As (Figura 4, línea 4), confirman la especificidad de la reacción de PCR para el DNA de *Cmm*. La reducción del tiempo de análisis para la detección de *Cmm*, también es influido por el uso de oligonucleótidos anidados (HCMA1S-HCMB1As y HCMC2S-HCMD2As) con una Tm de 62 °C y tiempos de alineamiento y de síntesis de 30s para la producción de amplicones de 250 pb. Estas condiciones reducen el tiempo total del programa de PCR, al disminuir el tiempo necesario para la amplificación de 4 h que se requerían con el anterior protocolo a 3 h, empleando como templado el DNA obtenido por hervido. En la Figura 4 (líneas 1 y 2), se muestra la síntesis de fragmentos específicos de 250 pb del gen *pat-1* (serina proteasa).

## Conclusiones

Se describe un procedimiento rápido, sencillo y preciso basado en PCR para la detección de *Cmm* patogénica que consume aproximadamente 4 h a partir del arribo de la muestra comparado con el método convencional que requiere 24 h, lo que permitirá establecer en menor tiempo, estrategias para evitar la diseminación del inóculo del cáncer bacteriano en plantas de jitomate.

## Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (161947) por la beca otorgada a la estancia posdoctoral del Dr. Jesús Frías-Pizano. De igual manera, se agradece al Dr. Sergio Aranda-Ocampo del Colegio de Postgraduados por el material biológico proporcionado.

to the fragment from *pat-1* gene (serine protease) which has been reported as a size of 614 bp (Dreier *et al.*, 1995), which was confirmed by sequencing the fragment.

The null amplification from DNA obtained by boiling from asymptomatic tomato plant and CMM5F and CMM6R (Figure 2, line 2) and HCMA1S-HCMB1As (Figure 4, line 4) oligonucleotides confirm the specificity of PCR reaction for *Cmm* DNA. Reducing the time of analysis to detect *Cmm*, also is influenced by the use of nested oligonucleotides (HCMA1S-HCMB1As and HCMC2S-HCMD2As) with a Tm of 62 °C and annealing time and synthesis of 30s for production of 250 bp amplicons. These conditions reduce the total time form PCR program, by decreasing the time required for amplification form 4h that were required with the above protocol to 3 h, using as temperate DNA obtained by boiling. In Figure 4 (lines 1 and 2), shows the synthesis of specific fragments of 250bp of *pat-1* gene (serine protease).

## Conclusions

A fast, simple and accurate method based on PCR to detect pathogenic *Cmm* that consumes approximately 4 h from the arrival of the sample compared to the conventional method that requires 24 h, which will allow to set in less time, strategies to prevent the spread of bacterial inoculum canker in tomato plants.

*End of the English version*



## Literatura citada

- Acosta, G. G.; Pantoja, H. M. A.; Muñoz, S. C. I.; Pérez, P. C.; Guevara, G. R. G.; Torres, P. I.; Delgadillo, S. F.; González, Ch. M. M. y Guevara, O. L. 2012. Transformación del hongo fitopatógeno *Sclerotium cepivorum* Berk empleando fusión de protoplastos. Rev. Méx. Cienc. Agríc. 3(7):1333-1345.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.
- Borboa, F. J.; Rueda, P. E.; Acedo, F. E.; Ponce, J. F.; Cruz, M.; Grimaldo, J. O. y García, O. A. M. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. Rev. Fitotec. Mex. 32(4):319-326.

- Burokiene, D. 2006. Early detection of *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* in tomato seedlings. *Agron. Res.* 4:151-156.
- Chang, R. J.; Ries, S. M. and Pataky, J. K. 1992. Effects of temperature, plant age, inoculum concentration and cultivar on the incubation period and severity of bacterial canker of tomato. *Plant Dis.* 76:1150-1155.
- De León, L.; Siverio, F.; López, M. M. and Rodríguez, A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant dis.* 95(11):1328-1338.
- Dellaporta, S. L.; Wood, J. and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA minipreparation version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 18:61-64.
- Dreier, J.; Bempohl, A. and Eichenlaub, R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology.* 85:462-468.
- Dreier, J.; Meletzus, D. and Eichenlaub, R. 1997. Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Mol. Plant Microbe Intact.* (102):195-206.
- Eichenlaub, R. and Gartemann K. H. 2011. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. Department of Genetechnology, Microbiology, Faculty of Biology, University of Bielefeld, Germany. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:445-464.
- EPPO. 2010. Diagnostics. *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*. *Bulletin* 40:353-364.
- Fatmi, M. and Schaad N. W. 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio, and Morocco. *Plant Pathol.* 51:149-154.
- Flores, D. 2014. Mexico: tomato annual: production down slightly next year while exports up slightly. USDA foreign agricultural service. Gain report number: MX4043.
- Franken, A. A. J. M.; Kamminga, G. C.; Snijders, W.; Van Der Zouwen, P. S. and Birnbaum, Y. E. 1993. Detection of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds by immunofluorescence microscopy and dilution plate. *Neth. J. Plant Pathol.* 99(3):125-137.
- Holmes, D. and Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analyt. Biochem.* 114:193-197.
- Kaneshiro, W. S. and Alvarez, A. M. 2001. Specificity of PCR and ELISA for hypovirulent and avirulent *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology.* 91:46.
- Milijašević, S.; Todorović, B.; Rekanović, E.; Potočnik, I. and balaž, J. 2007. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, bacterial canker of tomato: 2. Comparison of the effectiveness of extraction procedures and sensitivity of methods for detection in tomato seeds. *Pestic. Phytomed. Belgrade, Serbia.* 22(2):121-130.
- Milijasevic, M. S.; Gartemann, K. H.; Frohwitter, J.; Eichenlaub, R.; Todorovic, B.; Rekanovic, E. and Potocnik, I. 2012. Characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Serbia. *Eur. J. Plant Pathol.* 134(4):697-711. Normas regionales de la NAPPO (NAPPO). 2013. Organización norteamericana de protección a las plantas sobre medidas fitosanitarias (NRMF):1-8 pp.
- Nemeth, J.; Laszlo, E. and Emody, L. (1991). *Clavibacter michiganensis* ssp. *insidiosus* in lucerne seeds. *Bull. OEPP* 21:713-718.
- Pastrick, K. H. and Rainey, R. A. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *J. Phytopathol.* 171:687-693.
- Riley, I. T. 1987. Serological relationships between strains of coryneform bacteria responsible for annual ryegrass toxicity and other plants pathogenic corynebacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:153-159.
- Rodríguez, M. M. 2013. Biogeografía, diagnóstico y manejo integrado de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 31:32.
- SIAP. 2013. Una mirada al panorama agroalimentario de México y el mundo. SAGARPA. 18. [www.campomexicano.gob.mx/boletinsiap/018-e.html](http://www.campomexicano.gob.mx/boletinsiap/018-e.html).
- Sousa, S. M.; Cruz, L.; Norskov, P. and Rasmussen, O. F. 1997. A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. *Seed Sci. Technol.* 25:581-584.
- Zhao, W. J.; Chen, H. Y.; Zhu, S. F.; Xia, M. X. and Tan, T. W. 2007. One-step detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato seeds using a Taqman probe. *J. Plant Pathol.* 89(3):349-351.