

Response of tomato (*Solanum lycopersicum*) varieties to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection

Respuesta de variedades de jitomate (*Solanum lycopersicum*) a la infección con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Luis Martín Rivera-Sosa, Instituto Tecnológico Superior de la Sierra Norte de Puebla. Avenida José Luis Martínez Vázquez No. 2000 Jicolapa, Zacatlán, Puebla, CP 73310, México; ¹Gustavo Ramírez-Valverde, ¹Postgrado en Estadística, ²Postgrado en Genética, ³Postgrado en Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México; ²Beatriz Martínez-Yáñez, ³Alfonsina Judith-Hernández, ³Sergio Aranda-Ocampo*.

*Corresponding author: saranda@colpos.mx

Received: June 29, 2021.

Accepted: December 09, 2021.

Rivera-Sosa LM, Ramírez-Valverde G, Martínez-Yáñez B, Judith-Hernández A and Aranda-Ocampo S. 2022. Response of tomato (*Solanum lycopersicum*) varieties to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection. Mexican Journal of Phytopathology 40(1): 18-39.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2106-8>

First DOI publication: December 24, 2021.

Primera publicación DOI: 24 de Diciembre, 2021.

Abstract. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causes bacterial wilt and canker disease of tomato. The objectives of this research were i) to characterize and identify the most aggressive Cmm in Chignahuapan, Puebla, ii) to evaluate the tolerance in two phenological stages of 10 tomato varieties to infection by CP_Cmm-1 in the greenhouse and the *in vitro* sensitivity of the bacteria to bactericides. 12 Cmm isolates

Resumen. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) causa la enfermedad marchitez y cancro del jitomate. Los objetivos de esta investigación fueron i) caracterizar e identificar a Cmm más agresivo en Chignahuapan, Puebla, ii) evaluar la tolerancia en dos etapas fenológicas de 10 variedades de jitomate a la infección por CP_Cmm-1 en invernadero y la sensibilidad *in vitro* de la bacteria a bactericidas. Se colectaron 12 aislamientos de Cmm de plantas de jitomate y se seleccionó una cepa (CP_Cmm-1) con mayor agresividad de acuerdo al tiempo de manifestación de síntomas en plantas de la var. Reserva. Después, la cepa se inoculó por el corte con tijeras embebidas en una suspensión con 3×10^8 UFC mL⁻¹ en dos etapas fenológicas (a los cinco y 10 hojas verdaderas). Se evaluó la sintomatología durante 30 días después de la inoculación. Adicionalmente, se evaluó la sensibilidad de CP_Cmm-1 ante ocho bactericidas comerciales *in vitro*. Los resultados mostraron que la cepa CP_Cmm-1 se identificó con 97%

were collected from tomato plants and a strain (CP_Cmm-1) with greater aggressiveness was selected according to the time of manifestation of symptoms in plants of var. Reserva. Afterward, the strain was inoculated by cutting with scissors embedded in a suspension with 3×10^8 UFC mL⁻¹ in two phenological stages (at five and 10 true leaves). Symptoms were evaluated for 30 days after inoculation. Additionally, the sensitivity of CP_Cmm-1 to eight commercial bactericides *in vitro* was evaluated. The results showed that the CP_Cmm-1 strain was identified with 97% similarity with the API20 E system, positive with DAS-ELISA, and by PCR it showed 96.6% identity with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. The Sahel variety showed greater tolerance to infection (* = $p \leq 0.05$) both in the stage of five and 10 leaves; the varieties Sv4401, Nápoles, and Súper óptimo showed greater susceptibility in the five-leaf stage. The Sv4401 variety was highly susceptible in both stages. Neither variety was resistant to infection by CP_Cmm-1. The use of the Sahel variety and kasugamycin could reduce the damage of this bacteria.

Key words: bactericides, vascular infection, tolerance, bacteria, varieties.

The tomato (*Solanum lycopersicum*) is the second most consumed vegetable in the world and in Mexico it is the most important in the agri-food sphere (SADER, 2020). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) causes “wilt” and “bacterial canker” and it is the most destructive and recurring disease in the tomato crop. In Mexico, it causes an estimated economic loss of 40 million dollars a year (Borboa-Flores *et al.*, 2009). Cmm is an international quarantine pathogen (EFSA, 2014; EPPO, 2016). Wilt and canker are more

de similitud con el sistema API20 E, positivo con DAS-ELISA y por PCR mostró 96.6% de identidad con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. La variedad Sahel mostró mayor tolerancia a la infección (* = $p \leq 0.05$) tanto en la etapa de cinco como 10 hojas; las variedades Sv4401, Nápoles y Súper óptimo mostraron mayor susceptibilidad en la etapa de cinco hojas. La variedad Sv4401 fue altamente susceptible en ambas etapas. Ninguna variedad fue resistente a la infección por CP_Cmm-1. El uso de la variedad Sahel y kasugamicina podría reducir el daño de esta bacteria.

Palabras clave: bactericidas, infección vascular, tolerancia, bacteria, variedades.

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es la segunda hortaliza de mayor consumo en el mundo y en México es la más importante en el ámbito agroalimentario (SADER, 2020). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) causa la “marchitez” y “cancro bacteriano” y es la enfermedad más destructiva y recurrente en el cultivo de jitomate; en México, causa pérdidas económicas estimadas en 40 millones de dólares anuales (Borboa-Flores *et al.*, 2009). Cmm es un patógeno de cuarentena internacional (EFSA, 2014; EPPO, 2016). La marchitez y cancro son más severos en los sistemas de producción bajo cubierta debido a las condiciones ambientales y continuas prácticas de cultivo que favorecen la infección (Martínez-Castro *et al.*, 2018; Yuqing *et al.*, 2018). Cmm infecta los vasos del xilema y causa síntomas de marchitez, clorosis marginal de hojas y grietas (cancro) en el tallo (Bae *et al.*, 2015), se disemina principalmente por semilla (Nandi *et al.*, 2018), uso de plántula infectada, herramientas, suelo y agua (Tancos *et al.*, 2013), contacto del fluido de gutación entre plantas sanas y enfermas (Sharabani *et al.*, 2013a) y

severe in indoor production systems, due to the environmental conditions and continuous farming practices that promote infections (Martínez-Castro *et al.*, 2018; Yuqing *et al.*, 2018). Cmm infects the xylem vessels and causes symptoms of wilting, marginal leaf chlorosis and cracks (canker) on the stem (Bae *et al.*, 2015). It is disseminated mainly via seeds (Nandi *et al.*, 2018), the use of infected seedlings, tools, soil and water (Tancos *et al.*, 2013), contact with the guttation fluids between healthy and diseased plants (Sharabani *et al.*, 2013a) and nutrient solutions in hydroponic crops (Huang and Tu, 2001).

The Cmm strains with the most virulence harbor the plasmids pCM1(27.4 kb) and pCM2 (70.0 kb), which codify for the production of polysaccharides (EPS) and extracellular enzymes (Dreier *et al.*, 1997; Gartemann *et al.*, 2008), which confer pathogenicity, different degrees of virulence and aggressiveness between isolated strains from different areas of the world (Wasserman *et al.*, 2020; Yuqing *et al.*, 2018), as well as the ability to adapt to new habitats (Nandi *et al.*, 2018).

To date, no commercial varieties with complete resistance to Cmm have been found or other effective control measures, which causes severe epidemics (Nandi *et al.*, 2018). In other countries, tomato varieties with greater tolerance to the disease have been identified (Eichenlaub and Gartemann, 2011). Wild forms of tomato have Cmm-resistant genes, although the inheritance of these genes is complex and express undesirable traits, such as small fruits and low yields during genetic breeding (Bae *et al.*, 2015; Coaker *et al.*, 2004). Diverse control strategies have been studied, including chemical control, mainly using antibiotics and copper-based compounds (de León *et al.*, 2008; Milijašević *et al.*, 2009), biological control (Nandi *et al.*, 2018), the use of plant extracts (Muhammad *et al.*, 2020), bacteriocins (Mirzaee *et al.*, 2021) with a limited

solución nutritiva en cultivos hidropónicos (Huang y Tu, 2001).

Las cepas de Cmm con mayor virulencia albergan los plásmidos pCM1(27.4 kb) y pCM2 (70.0 kb), que codifican para la producción de polisacáridos (EPS) y enzimas extracelulares (Dreier *et al.*, 1997; Gartemann *et al.*, 2008); que confieren patogenicidad, diferente grado de virulencia y agresividad entre cepas aisladas de distintas regiones en el mundo (Wasserman *et al.*, 2020; Yuqing *et al.*, 2018), así como la habilidad para adaptarse a nuevos hábitats (Nandi *et al.*, 2018).

Hasta la fecha no se han desarrollado variedades comerciales con resistencia completa a Cmm, ni otra medida de control efectiva lo cual ocasiona severas epidemias (Nandi *et al.*, 2018). En otros países, se han identificado variedades de jitomate con mayor tolerancia a la enfermedad (Eichenlaub y Gartemann, 2011). Formas silvestres de jitomate albergan genes de resistencia contra Cmm; sin embargo, la herencia de estos genes es compleja y expresan caracteres indeseables como fruto pequeño y bajo rendimiento durante el mejoramiento genético (Bae *et al.*, 2015; Coaker *et al.*, 2004). Se han estudiado diversas estrategias de control las cuales incluyen el control químico principalmente con antibióticos y compuestos a base cobres (de León *et al.*, 2008; Milijašević *et al.*, 2009), biológico (Nandi *et al.*, 2018), uso de extractos de plantas (Muhammad *et al.*, 2020), bacteriocinas (Mirzaee *et al.*, 2021) con limitada eficacia en muchos casos debido a la alta variación en la agresividad y virulencia del patógeno, así como su adaptación a ciertos genotipos y sistemas de producción de jitomate (Croce *et al.*, 2016).

En los últimos cinco años, en la localidad de Chignahuapan, Puebla se identificaron brotes de la enfermedad en jitomate cultivados en invernadero; hasta la fecha, no hay ningún estudio sobre la respuesta a la infección por Cmm en las variedades

efficacy, in many cases due to the high variation in the aggressiveness and virulence of the pathogen, as well as its adaptation to certain genotypes and tomato production systems (Croce *et al.*, 2016).

In the last five years, in Chignahuapan, Puebla, outbreaks of the disease were identified in greenhouse-grown tomato, and to date, there are no studies on the response to the infection by Cmm in the varieties planted in this region. Our hypothesis establishes that there are tomato varieties with a greater tolerance to infections caused by aggressive Cmm strains and that this pathogen is sensitive to commercial bactericides available in the region. The identification of tomato varieties with a greater tolerance to the infection by Cmm and the use of effective bactericides can contribute to a better management and reduce the economic damage caused by this disease. Due to this, the aims of this investigation were: i) to characterize and identify the more aggressive Cmm in Chignahuapan, Puebla, ii) to evaluate the tolerance in two phenological stages of 10 varieties of tomato to infection by the more aggressive Cmm in the greenhouse and the sensitivity *in vitro* of the bacteria to bactericides.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of the pathogen and growth conditions

In 2019, stems and leaves were gathered in greenhouses from tomato plants of the Benedetti (19° 52' 11.2" N 98° 02' 10.7" W), Reserva (19° 52' 12.9" N 98° 02' 12.8" W) and Pai Pai (19° 52' 17.4" N 98° 02' 15.3" W) varieties with symptoms of wilt in the location of Chignahuapan, Puebla. The tissue samples (0.5 cm) were disinfested with sodium hypochlorite at 1% and washed three times with sterile distilled water. They were then placed in tubes with 3 mL of a sterile salt solution (0.85%) for 1 h. Out of this suspension, 20 µL were plated

cultivadas en esta región. Nuestra hipótesis establece que hay variedades de jitomate con mayor tolerancia a la infección por cepas agresivas de Cmm y que este patógeno es sensible a bactericidas comerciales disponibles en esta región. La identificación de variedades de jitomate con mayor tolerancia a la infección por Cmm y el uso de bactericidas efectivos puede contribuir a un mejor manejo y reducir el daño económico causado por esta enfermedad. Por lo anterior, los objetivos de esta investigación fueron: i) caracterizar e identificar a Cmm más agresivo en Chignahuapan, Puebla, ii) evaluar la tolerancia en dos etapas fenológicas de 10 variedades de jitomate a la infección por Cmm más agresivo en invernadero y la sensibilidad *in vitro* de la bacteria a bactericidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del patógeno y condiciones de crecimiento

En 2019, se recolectaron tallos y hojas de plantas de jitomate en invernaderos de las variedades Benedetti (19° 52' 11.2" N 98° 02' 10.7" W), Reserva (19° 52' 12.9" N 98° 02' 12.8" W) y Pai Pai (19° 52' 17.4" N 98° 02' 15.3" W) con síntomas de marchitez en la localidad de Chignahuapan, Puebla. Las muestras de tejido (0.5 cm) se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% y se lavaron tres veces con agua destilada estéril; después se colocaron en tubos con 3 mL de solución salina (0.85%) estéril durante 1 h. 20 µL de esta suspensión se sembró en medio de cultivo agar nutritivo (AN) (Sigma-Aldrich) y se incubó a 28 °C por 48 h. Las bacterias purificadas se identificaron morfológicamente de acuerdo a Cmm (EPPO, 2016). Las bacterias se preservaron en cultivo criogénico a -80 °C en medio Luria Bertani (Merck) y 40% de glicerol.

on nutrient agar culture medium (NA) (Sigma-Aldrich) and incubated at 28 °C for 48 h. The purified bacteria were morphologically identified according to Cmm (EPPO, 2016). The bacteria were preserved in a cryogenic culture at -80 °C in a Luria Bertani medium (Merck) and 40% of glycerol.

Agressiveness of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

The Cmm isolates (CP_Cmm-1 to CP_Cmm-12) were individually inoculated in three var. Reserva tomato seedlings in a greenhouse in a phenological stage of four true leaves. The inoculation was carried out by cutting the apical leaf with scissors soaked (Thyr, 1968) in a cellular suspension with 3×10^8 UFC mL⁻¹ based on the pattern of turbidity of the McFarland standard (McFarland, 1907). The appearance of wilt symptoms in inoculated plants was recorded for 13 days and the most aggressive isolation was selected (the Cp_Cmm-1 strain in this study) based on the period of incubation (PI), which was considered as the time (days) between inoculation and the appearance of symptoms in the inoculated plants. The control plants were inoculated with sterile distilled water. From the internal tissues of the stem of the plants with symptoms of wilt, bacteria with the same phenotypical characteristics of the inoculated strain were reisolated and identified as Cmm using PCR.

Characterization and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Isolation CP_Cmm-1 was characterized according to the protocols described by Schaad *et al.* (2001). In addition, the API20 E (Biomerieux, Durhan, NC, U.S.A.) systems were used, along with the commercial kit DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Agresividad de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Los aislamientos de Cmm (CP_Cmm-1 a CP_Cmm-12) se inocularon individualmente en tres plántulas de jitomate var. Reserva en invernadero en estado fenológico de cuatro hojas verdaderas; la inoculación se realizó mediante el corte de la hoja apical con tijeras embebidas (Thyr, 1968) en una suspensión celular con 3×10^8 UFC mL⁻¹ basado en el patrón de turbidez de la escala de McFarland (McFarland, 1907). La aparición de síntomas de marchitez en las plantas inoculadas se registró durante 13 días y se seleccionó el aislamiento más agresivo (cepa CP_Cmm-1 en este estudio) basado en el periodo de incubación (PI) el cual se consideró como el tiempo (días) transcurrido entre la inoculación y la aparición de síntomas de marchitez en las plantas inoculadas. Las plantas testigo se inocularon con agua destilada estéril. Del tejido interno del tallo de las plantas con síntomas de marchitez se reaislaron bacterias con las mismas características fenotípicas de la cepa inoculada y se identificó como Cmm por PCR.

Caracterización e identificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

El aislamiento CP_Cmm-1 se caracterizó de acuerdo a los protocolos descritos por Schaad *et al.* (2001). Además, se utilizaron los sistemas API20 E (Biomerieux, Durhan, NC, U.S.A.) y el kit comercial DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (Agdia® Inc, SRA 44000/0096) con anticuerpos específicos para Cmm. Así mismo, se infiltró una suspensión con 3×10^8 UFC mL⁻¹ de la cepa CP_Cmm-1 en el envés de hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y maravilla (*Mirabilis jalapa*).

Para la identificación por PCR, el ADN de la cepa CP_Cmm-1 se obtuvo de colonias individuales

(Agdia® Inc, SRA 44000/0096) with specific antibodies for Cmm. Likewise, a suspension was infiltrated, with 3×10^8 UFC mL⁻¹ of the CP_Cmm-1 strain on the abaxial surface of tobacco (*Nicotiana tabacum*) and four o'clock plants (*Mirabilis jalapa*) leaves.

For identification by PCR, the DNA of the CP_Cmm-1 strain was taken from individual colonies with a 72 h growth at 28 °C in NA medium with a PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.), following the protocol by the manufacturer. Using PCR, plasmid pCM2 was amplified, which harbors the specific fragment of the gene *pat-1* (serine protease) of 614 pb of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with the primers CMM5F-5'GCGAATAAGCCCATATCAA 3' and CMM6R-5' CGTCAGGAGGTCGCTAATA 3' and the PCR conditions described by Dreier *et al.* (1997). The PCR was carried out in a thermal cycler (C1000 Touch TM Thermal Cycler) and the amplified fragments were sequenced in the Institute of Biotechnology of the UNAM (IBT). The sequences were compared in the GenBank of the National Center of Biotechnology Information (NCBI), using the algorithm Blastx (Altschul *et al.*, 1990) of the National Center of Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

Inoculation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato varieties

This study was carried out as a factorial in a randomized complete block design with four repetitions; the first factor used 10 tomato varieties: 1) Benedetti, 2) Reserva, 3) Malvia, 4) USATX12227, 5) Sahel, 6) Pai-Pai, 7) Súper óptimo, 8) Nápoles 9) Sv4401, and 10) Tobalá. After the germination of the seed, the seedlings

con 72 h de crecimiento a 28 °C en medio AN con el kit PureLink Genomic DNA Kits (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.) siguiendo el protocolo del fabricante. Por PCR se amplificó el plásmido pCM2 que alberga el fragmento específico del gen *pat-1* (serina proteasa) de 614 pb de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* con los iniciadores CMM5F-5'GCGAATAAGCCCATATCAA 3' y CMM6R-5' CGTCAGGAGGTCGCTAATA 3' y condiciones de PCR descritos por Dreier *et al.* (1997). La PCR se realizó en un termociclador (C1000 Touch TM Thermal Cycler) y los fragmentos amplificados se secuenciaron en el Instituto de Biología de la UNAM (IBT). Las secuencias se compararon en el banco de genes (Gen Bank) del Centro Internacional para la Información en Biología (NCBI-National Center of Biotechnology Information), empleando el algoritmo Blastx (Altschul *et al.*, 1990) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

Inoculación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en variedades de jitomate

Este estudio se realizó como un factorial en un diseño bloques completos al azar con cuatro repeticiones; el primer factor utilizó 10 variedades de jitomate: 1) Benedetti, 2) Reserva, 3) Malvia, 4) USATX12227, 5) Sahel, 6) Pai-Pai, 7) Súper óptimo, 8) Nápoles 9) Sv4401 y 10) Tobalá. Después de la germinación de la semilla; las plántulas se trasplantaron en bolsas de plástico negro (2 kg), con una mezcla de peat moss, tierra vega y tepezil (2:1:1) y se mantuvieron en invernadero con una humedad relativa >70 y temperatura entre 30 y 33 °C. Las plantas se regaron diariamente y se fertilizaron dos veces por semana con la formulación nutritiva Steiner (Steiner, 1984).

were transplanted in black plastic bags (2 kg), with a mixture of peat moss, tierra vega and tepezil (2:1:1) and were kept in the greenhouse with a relative humidity of >70 and temperatures between 30 and 33 °C. The plants were irrigated on a daily basis and fertilized twice a week with the Steiner nutrient formulation (Steiner, 1984).

The CP_Cmm-1 strain was inoculated in the apical leaf of each tomato variety (n=10) by cutting with scissors soaked in a cellular suspension (Thyr, 1968) adjusted with 3×10^8 UFC mL⁻¹ using the McFarland standard and confirmed by counting in a plate in an NA medium after 72 h at 28 °C (Klement *et al.*, 1990). The second factor contemplated two phenological stages in independent treatments for the development of 1) five true leaves, 2) 10 true leaves. Each variety was inoculated in 10 plants (repetitions). The inoculation of all varieties was simultaneous and was carried out in a timeframe of 60 min. The control plants were inoculated with sterile distilled water. The appearance of symptoms was registered every day for 30 days after inoculation (dai). In order to evaluate the severity, an arbitrary visual scale was designed, which went from 0 to 4, where 0= healthy plant, 1= leaf wilt, 2= epinasty, leaf chlorosis, 3= stem vessel colonization and 4=canker in stem and internal colonization of the fruit. The variable analyzed was time (number of days to severity degree 4) with the interaction tomato variety-phenological stage-development of symptoms. The data were analyzed using the statistical program R version 4.0.5 (Avello and Seisdedo, 2017). From the internal tissue of the stem of each variety, the inoculated bacteria was reisolated and identified using PCR.

Sensitivity *in vitro* to bactericides

Eight commercial bactericides were evaluated in the concentration recommended on the label,

La cepa CP_Cmm-1 se inoculó en la hoja apical de cada variedad de jitomate (n=10) mediante el corte con tijeras embebidas en una suspensión celular (Thyr, 1968) ajustada con 3×10^8 UFC mL⁻¹ utilizando la escala de McFarland y confirmado por recuento en placa en medio AN después de 72 h a 28 °C (Klement *et al.*, 1990). El segundo factor contempló dos etapas de desarrollo fenológico en tratamientos independientes, al desarrollo de 1) cinco hojas verdaderas, 2) 10 hojas verdaderas. Cada variedad se inoculó en 10 plantas (repeticiones). La inoculación de todas las variedades fue simultánea y se realizó en un periodo de 60 min. Las plantas testigo se inocularon con agua destilada estéril. La aparición de síntomas se registró diariamente durante 30 días después de la inoculación (ddi); para evaluar la severidad, se diseñó una escala visual arbitraria de 0 a 4 donde 0= planta sana, 1= marchitez de hojas, 2= epinastia, clorosis de hojas, 3= colonización vascular de tallo y 4=cancro en tallo y colonización interna del fruto. La variable analizada fue el tiempo (número de días en llegar al grado 4 de severidad) con la interacción de los factores: variedad de jitomate-etapa fenológica- desarrollo de síntomas. Los datos se analizaron con el programa estadístico R versión 4.0.5 (Avello y Seisdedo, 2017). Del tejido interno del tallo de cada variedad se reaisló la bacteria inoculada y se identificó por PCR.

Sensibilidad *in vitro* a bactericidas

Se evaluaron ocho bactericidas comerciales a la concentración recomendada en etiqueta, en stock de 25 mL de agua: 1) Sulfato de estreptomycin + Oxitetraciclina + Sulfato tribásico de cobre monohidratado, 1.5 g (Cuprimicin 500) (Ingeniería Industrial); 2) Estreptomycin + Oxitetraciclina, 0.2 g (Bactrol 2x) (Ingeniería industrial); 3) Clorhidrato de oxitetraciclina, 0.5 g (Cuprimicin Agrícola 5%)

in a stock with 25 mL of water: 1) Streptomycin sulfate + Oxytetracycline + Tribasic copper sulfate monohydrate, 1.5 g (Cuprimycin 500) (Industrial Engineering); 2) Streptomycin + Oxytetracycline, 0.2 g (Bactrol 2x) (Industrial Engineering); 3) Oxytetracycline Hydrochloride, 0.5 g (Agricultural Cuprimycin 5%) (Industrial Engineering); 4) Streptomycin + Oxytetracycline, 1 g (Agricultural Bactiomycin) (AgriBest); 5) Ammonium Quaternary, 3.5 mL (Quatz IV) (Alterna Agro); 6) Kasugamycin, 0.17 mL (Kasumin) (Gowan Mexicana); 7) Streptomycin sulfate, 0.2 g (Cuprimycin 17) (Industrial Engineering); 8) Gentamicin sulfate + Oxytetracycline Hydrochloride, 1.5 g (Final Bacter) (FormulAbagro of Mexico).

The test for *in vitro* sensitivity against the CP_Cmm-1 strain was carried out using the method described by Jung *et al.* (2014), modified: The *Clavibacter* inoculant was obtained from a pure 48 h culture at 28 °C in nutrient agar medium, and afterwards, followed by the preparation of an aqueous solution with 1×10^8 UFC mL⁻¹. Sensitivity was evaluated on 96-well polystyrene microplates (Thermo Scientific™); each 80 µL well with a nutrient broth medium was added 10 µL of *Clavibacter* inoculant and 10 µL of the bactericidal solution; the control consisted of the inoculation of *Clavibacter* in a nutrient broth without bactericide. The microplates were incubated at 28 °C and the absorbance was registered at an optic density (DO) of 600 nm after 0, 12, 24, 48, 60, 72 and 84 h of growth in a Multiskan Ascent V1.24 354-01843 Version-1.9.1 reader. The sensitivity to the bactericides by Cmm was determined by the lowest value of DO in the co-cultivation of the pathogen with the bactericide in regard to the control. A factorial design was carried out with

(Ingeniería Industrial); 4) Estreptomina + Oxite-traciclina, 1 g (Bactiomycin Agrícola) (AgriBest); 5) Cuaternario de Amonio, 3.5 mL (Quatz IV) (Alterna Agro); 6) Kasugamicina, 0.17 mL (Kasumin) (Gowan Mexicana); 7) Sulfato de estreptomina, 0.2 g (Cuprimicin 17) (Ingeniería Industrial); 8) Sulfato de Gentamicina + Clorhidrato de Oxite-traciclina, 1.5 g (Final Bacter) (FormulAbagro de México).

La sensibilidad *in vitro* contra la cepa CP_Cmm-1 se realizó por el método descrito por Jung *et al.* (2014) modificado: El inóculo de *Clavibacter* se obtuvo de un cultivo puro de 48 h a 28 °C en medio agar nutritivo; de aquí, se preparó una suspensión acuosa con 1×10^8 UFC mL⁻¹. La sensibilidad se evaluó en microplacas de poliestireno (Thermo Scientific™) con 96 pocillos; a cada pocillo con 80 µL de medio caldo nutritivo se le agregó 10 µL de inóculo de *Clavibacter* y 10 µL de la solución bactericida; el testigo consistió de la inoculación de *Clavibacter* en caldo nutritivo sin bactericida. Las microplacas se incubaron a 28 °C y se registró la absorbancia a una densidad óptica (DO) de 600 nm a las 0, 12, 24, 48, 60, 72 y 84 h de crecimiento en un lector Multiskan Ascent V1.24 354-01843 Version-1.9.1. La sensibilidad a los bactericidas por Cmm se determinó por el menor valor de DO en el co-cultivo del patógeno con el bactericida con respecto al testigo. Se realizó un diseño factorial con medidas repetidas utilizando un modelo mixto donde los bloques y unidades experimentales son aleatorios, el modelo se ajustó con una función de correlación sin estructura entre tiempos, se contempló la heterogeneidad de varianza entre tratamientos en el modelo; todos los tratamientos se evaluaron por triplicado. Los datos de la interacción de Cmm con el bactericida se analizaron con el programa estadístico InfoStat versión 1.5 (Grupo Infostat 2003).

repeated measurements using a mixed model in which experimental blocks and units were random; the model was adjusted with a correlation function without structure between times, the variance heterogeneity between treatments in the model was contemplated, and all treatments were evaluated in triplicate. The data of the interaction of Cmm with the bactericide were analyzed with the InfoStat statistical program, version 1.5 (Infostat Group 2003).

RESULTS AND DISCUSSION

Characterization and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

The 12 Cmm isolations incubated in tomato var. Reserva caused wilt, although the period of incubation (PI) was different between the isolations. The symptoms of wilt in the inoculated seedlings were observed in a range of 5 to 12 dai. The CP_Cmm-1 isolation from *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (isolated from the var. Reserva) displayed greater aggressiveness, causing wilt 5 dai (PI), hence its selection for this study. In control plants, no symptoms were observed to develop. These results coincide with reports by Tancos *et al.* (2013), who displayed differences in virulence between strains of Cmm. Other studies identified haplotypes of Cmm with greater virulence and aggressiveness in some tomato-producing areas than in others and they suggest the existence of types of sequences that adapt to certain regions, tomato genotypes, weather conditions and production systems (Croce *et al.*, 2016; Martínez-Castro *et al.*, 2018; Thapa *et al.*, 2017). This diversity may be caused by the introduction of new strains of Cmm of a different origin, mainly due to seed imports (Yuqing *et al.*,

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización e identificación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Los 12 aislamientos de Cmm inoculados en jitomate var. Reserva causaron marchitez; sin embargo, el periodo de incubación (PI) fue diferente entre los aislamientos. Los síntomas de marchitez en las plántulas inoculadas se observaron en un rango entre 5 y 12 ddi. El aislamiento CP_Cmm-1 de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (aislado de la var. Reserva) mostró mayor agresividad causando marchitez a los 5 ddi (PI) por lo que se seleccionó para este estudio. En las plantas testigo no se observó el desarrollo de ningún síntoma. Estos resultados coinciden con lo reportado por Tancos *et al.* (2013) quienes demostraron diferencias en la virulencia entre cepas de Cmm. Otros estudios identificaron haplotipos de Cmm con mayor virulencia y agresividad en algunas zonas productoras de jitomate que en otras y sugieren la existencia de tipos de secuencia que se adaptan a determinada región, genotipo de jitomate, condiciones de clima y sistema de producción (Croce *et al.*, 2016; Martínez-Castro *et al.*, 2018; Thapa *et al.*, 2017). Esta diversidad puede ser consecuencia de la introducción de nuevas cepas de Cmm de diferente origen principalmente por la importación de semilla (Yuqing *et al.*, 2018). La caracterización fenotípica de la cepa CP_Cmm-1 mostró el crecimiento de colonias amarillo-naranja en medio YDC, Gram positivas, no móviles, metabolismo oxidativo de glucosa, oxidasa negativa, produjeron ácido a partir de manosa, pero no de manitol, ribosa, sorbitol e inulina, hidroliza esculina pero no caseína, utilizan como fuente de carbono acetato y succinato de sodio; estas características se reportaron previamente para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (EPPO, 2016; Schaad *et al.*, 2001).

2018). The phenotypic characterization of the CP_Cmm-1 strain displayed the growth of yellow-orange colonies in a YDC medium, Gram positive, not motile, glucose oxidative metabolism, negative oxidase, which produced acid from mannose although not from mannitol, ribose, sorbitol and inulin, hydrolyze esculin but not casein, use acetate and sodium succinate as carbon sources; these characteristics were previously reported for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (EPPO, 2016; Schaad *et al.*, 2001).

The phenotype of the CP_Cmm-1 strain coincided by 97% with the API20 E system, and it was positive by serology with the DAS-ELISA system. Using PCR, the fragment of gene *pat-1* (serine protease) of 614 pb of plasmid pCM2 of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* was amplified with primers CMM5F and CMM6R. The gene *pat-1* (serine protease) confers pathogenicity into Cmm and is an important virulence determinant for the production of extracellular polysaccharides, cellulases, glucanases and other enzymes, which induce diseases in tomato via the degradation of the cell wall in the xylem vessels, causing the symptom of wilt (Eichenlaub and Gatermann, 2011; Wassermann *et al.*, 2020). The comparison of the sequence in the GenBank of the amplified PCR product of the Cp_Cmm-1 strain displayed a 96.6% identity with *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB 382 plasmid pCM2 (accession AM711866.1). The infiltration of the Cp_Cmm-1 strain in the abaxial surface of tobacco and four o'clock leaves induced a hypersensitivity reaction, which coincides with reports by Alarcón *et al.* (1998) and Lu *et al.* (2015), who proved the induction of hypersensitivity in these same plant species with the expression of the protein ChpG with virulent Cmm strains. The results of the identification of the Cp_Cmm-1 strain comply with the official protocol for the

El fenotipo de la cepa CP_Cmm-1 coincidió 97% con el sistema API20 E, y fue positivo por serología con el sistema DAS-ELISA. Por PCR se amplificó el fragmento del gen *pat-1* (serina proteasa) de 614 pb del plásmido pCM2 de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* con los iniciadores CMM5F y CMM6R. El gen *pat-1* (serina proteasa) confiere patogenicidad en Cmm y es un importante determinante de virulencia para la producción de polisacáridos extracelulares, celulasas, glucanastas y otras enzimas, que inducen enfermedad en jitomate por la degradación de la pared celular en los vasos del xilema, causando el síntoma de marchitez (Eichenlaub y Gatermann, 2011; Wassermann *et al.*, 2020). La comparación de la secuencia en el GenBank del producto amplificado de PCR de la cepa Cp_Cmm-1, mostró 96.6% de identidad con *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB 382 plásmido pCM2 (accesión AM711866.1). La infiltración de la cepa CP_Cmm-1 en el envés de hojas de tabaco y maravilla indujo una reacción de hipersensibilidad lo cual coincide con lo reportado por Alarcón *et al.* (1998) y Lu *et al.* (2015), quienes demostraron la inducción de hipersensibilidad en estas mismas especies de plantas por la expresión de la proteína ChpG con cepas de Cmm virulento. Los resultados de la identificación de la cepa CP_Cmm-1 cumplen con el protocolo oficial para la caracterización e identificación de Cmm en muestras sintomáticas de jitomate, el cual sugiere la combinación de pruebas bioquímicas, serológicas, moleculares y patogenicidad de acuerdo con EPPO (2016).

Respuesta de jitomate a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

La respuesta de las 10 variedades de jitomate inoculadas con la cepa Cp_Cmm-1 fue diferente. La técnica de inoculación mediante el corte

characterization and identification of Cmm in symptomatic tomato samples, which suggests the combination of biochemical, serological, molecular and pathogenicity tests, according to EPPO (2016).

Response of tomato to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

The response of the 10 tomato varieties inoculated with the Cp_Cmm-1 strain was different. The inoculation technique of cutting the petiole with scissors soaked in the inoculant is considered quick and adequate for the evaluation of tolerance to the systemic infection by Cmm (van Steekelenburg, 1985). The symptoms and severity of the disease were different throughout time and dependent on the phenological stage (age of the plant and number of leaves). In all varieties but one, the appearance of symptoms was quicker and more severe in the inoculated plants with five than with 10 true leaves. This suggests that the genetic characteristics and the phenological stage of each variety are important factors for the expression of virulence by Cmm. These results suggest that the lower the plant development, the higher the susceptibility and severity of the infection caused by this pathogen will be.

The symptoms in both phenological stages (five and 10 leaves) during and at the end of the evaluation (30 dai) included all the degrees of severity (leaf wilt, chlorosis, vascular infection, canker in the stem and colonization of the fruit) in all varieties. However, the results of the statistical analysis with the interaction of the factors variety of tomato-phenological stage -development of symptoms indicated that the Sahel variety was significantly different to the rest (*= $p \leq 0.05$) with the higher average of days (13.7 and 14.5) for the appearance and development of all the symptoms, both in the five leaf and the 10 true leaf stages,

del peciolo con tijeras embebidas en el inóculo se considera rápida y adecuada para la evaluación de tolerancia a la infección sistémica por Cmm (van Steekelenburg, 1985). Los síntomas y la severidad de la enfermedad fueron diferente a través del tiempo y dependiente de la etapa fenológica (edad de la planta y número de hojas). En todas las variedades, excepto una, la aparición de síntomas fue con mayor rapidez y severidad en las plantas inoculadas con cinco que con 10 hojas verdaderas. Lo anterior sugiere que las características genéticas y la etapa fenológica de cada variedad son factores importantes para la expresión de virulencia por Cmm; estos resultados sugieren que a menor desarrollo de la planta la susceptibilidad y severidad por la infección de este patógeno es mayor.

Los síntomas en ambas etapas fenológicas (cinco y 10 hojas) durante y al final de la evaluación (30 ddi) incluyeron todos los grados de severidad (marchitez de hojas, clorosis, infección vascular, cancro en tallo y colonización del fruto) en todas las variedades. Sin embargo, los resultados del análisis estadístico con la interacción de los factores: variedad de jitomate-etapa fenológica- desarrollo de síntomas, indicaron que la variedad Sahel fue diferente significativamente del resto (*= $p \leq 0.05$) con el mayor promedio de días (13.7 y 14.5) para la aparición y desarrollo de todos los síntomas tanto en la etapa de cinco como 10 hojas verdaderas respectivamente. Así mismo, esta variedad mostró la menor severidad de síntomas, lo que sugiere mayor tolerancia a la infección por Cmm en ambas etapas fenológicas que el resto de las variedades. En contraste, las variedades Sv4401, Nápoles y Súper óptimo fueron altamente susceptibles en la etapa de cinco hojas. Entre estas, la variedad Sv4401 mostró la mayor susceptibilidad y severidad entre todas las variedades en las dos etapas fenológicas (cinco y 10 hojas), con el menor promedio (5.5 y 9 días) respectivamente para la aparición y desarrollo

respectively. Likewise, this variety displayed the lowest severity of symptoms, suggesting a higher tolerance to the infection by Cmm in both phenological stages than the rest of the varieties. By contrast, varieties Sv4401, Nápoles and Súper óptimo were highly susceptible in the five-leaf stage. Among these, variety Sv4401 displayed the highest susceptibility and severity out of all varieties in the two phenological stages (five and 10 leaves), with the lowest average (5.5 and 9 days, respectively) for the appearance and development of the symptoms (Table 1). In addition, the plants of this variety displayed lower heights, abundant bacterial exudate in petioles, stems with severe canker, and an extensive internal colonization of the fruit.

These results are similar to those obtained in other investigations. In greenhouse trials, Stüwe and Tiederman *et al.* (2013) identified tomato genotypes that display a higher severity of symptoms caused

de los síntomas (Cuadro 1); además, las plantas de esta variedad mostraron un porte de menor altura, abundante exudado bacteriano en peciolos, tallos con cancro severo, y extensiva colonización interna del fruto.

Estos resultados son similares a otras investigaciones; Stüwe y Tiederman *et al.* (2013), en ensayos de invernadero identificó genotipos de jitomate que mostraron mayor severidad de síntomas causados por Cmm en contraste con otros bajo las mismas condiciones experimentales de inoculación. Así mismo, los resultados de nuestro estudio evidencian la dificultad de encontrar variedades de jitomate tolerantes a la infección causado por Cmm; en un estudio en China, cinco de 25 genotipos de jitomate se catalogaron como moderadamente resistentes y ninguno con alta resistencia o resistencia completa a la infección por Cmm (Yuqing *et al.*, 2018); en tanto Kabas *et al.* (2018) de 78 genotipos clasificó 55% como muy susceptibles, 39% susceptibles,

Table 1. Interaction of variety, phenological stage, days of appearance of symptoms and severity in 10 tomato varieties inoculated with the CP_Cmm-1 strain of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Cuadro 1. Interacción de variedad, etapa fenológica, días de aparición de síntomas y severidad en 10 variedades de jitomate inoculados con la cepa CP_Cmm-1 de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Inoculación etapa fenológica cinco hojas verdaderas		Inoculación etapa fenológica 10 hojas verdaderas	
Variedad Jitomate	Media días desarrollo de síntomas	Variedad Jitomate	Media días desarrollo de síntomas
Sahel	13.75 a ^z	Sahel	14.50 a ^z
Tobalá	10.50 b	Malvia	14.00 b
Benedetti	10.50 b	USA12227	12.75 c
Reserva	10.25 bc	Benedetti	12.75 c
Malvia	10.00 c	Reserva	12.50 c
Pai-Pai	9.75 h	Tobalá	12.50 c
USA12227	9.75 h	Súper óptimo	11.75 d
Súper óptimo	8.75 i	Pai-Pai	11.50 de
Nápoles	7.50 j	Nápoles	11.25 e
Sv4401	5.50k	Sv4401	9.00 f

Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS= 0. 44431. Error: 0.0985 gl: 57. / Test: LSD Fisher Alfa=0.05 DMS= 0. 44431. Error: 0.0985 gl: 57.

^zMeans with a common letter are not significantly different (*= p≤0.05). / ^zMedias con una letra común no son significativamente diferentes (*= p≤0.05).

by Cmm in contrast to others under the same experimental inoculation conditions. Likewise, the results of our study display the difficulty of finding tomato varieties which are tolerant to the infection caused by Cmm. In a study in China, five out of 25 tomato genotypes were catalogued as moderately resistant and none had a high or complete resistance to infection by Cmm (Yuqing *et al.*, 2018). Meanwhile, Kabas *et al.* (2018), out of 78 genotypes, classified 55% as very susceptible, 39% as susceptible, 4% as moderately resistant and only 2% as tolerant to infection by Cmm.

Diverse factors explain the severity of the symptoms caused by the Cmm infection among different tomato genotypes, one of which is the age of the plant. Nandi *et al.* (2018) and Sharabani *et al.* (2013b) showed that some tomato varieties that become infected in late development stages can be asymptomatic or develop slow wilt. However, in early infections, the bacteria multiply in the xylem vessels and forms biofilms (Lelis *et al.*, 2014), which help it colonize with high densities and cause a systemic infection that originates severe wilt symptoms, stem canker, vascular discoloring and infection of the fruit (Bae *et al.*, 2015; Chalupowicz *et al.*, 2012; Tancos *et al.*, 2013). In this study, these same symptoms were observed in the most susceptible varieties with the inoculation of the Cp_Cmm-1 strain (Figure 1).

Systemic infection in tomato varieties

The systemic infection by Cmm produces the symptoms of leaf wilting and chlorosis, damage in the xylem and infection of the fruit. In this investigation, the 10 varieties inoculated with the Cp_Cmm-1 strain developed all these symptoms, except the Sahel variety. The difference in the severity of the symptoms was evident between the variety with the highest tolerance and the most

4% moderadamente resistentes y únicamente 2% como tolerantes a la infección por Cmm.

Diversos factores explican la severidad de los síntomas causados por la infección de Cmm entre diferentes genotipos de jitomate; uno de ellos es la edad de la planta; Nandi *et al.* (2018) y Sharabani *et al.* (2013b) mostraron que algunas variedades de jitomate que se infectan en etapas de desarrollo tardías, pueden ser asintomáticas o desarrollar marchitez lenta; sin embargo, en infecciones tempranas, la bacteria se multiplica en los vasos del xilema y forma biopelículas (Lelis *et al.*, 2014) que le permite colonizar con altas densidades y causar una infección sistémica que origina síntomas severos de marchitez, cancro en tallo, discoloración vascular e infección del fruto (Bae *et al.*, 2015; Chalupowicz *et al.*, 2012; Tancos *et al.*, 2013); en este estudio, estos mismos síntomas se observaron en las variedades más susceptibles con la inoculación de la cepa CP_Cmm-1 (Figura 1).

Infección sistémica en variedades de jitomate

La infección sistémica por Cmm produce los síntomas de marchitez y clorosis de hojas, daño en el xilema, cancro en tallo e infección del fruto. En esta investigación, las 10 variedades inoculadas con la cepa Cp_Cmm-1 desarrollaron todos estos síntomas excepto la variedad Sahel. La diferencia en la severidad de los síntomas fue evidente entre la variedad con mayor tolerancia y las de mayor susceptibilidad (Figura 1). El desarrollo del síndrome está relacionado con la infección de cepas altamente virulentas de Cmm (Chalupowicz *et al.*, 2017), lo que sugiere que la cepa Cp_Cmm-1, utilizada en este estudio, podría encontrarse en este grupo.

La infección sistémica, marchitez y clorosis de hojas, cancro en tallo e infección del fruto fue más severa en las variedades susceptibles Súper óptimo, USATX12227 y Sv4401; en contraste con la variedad

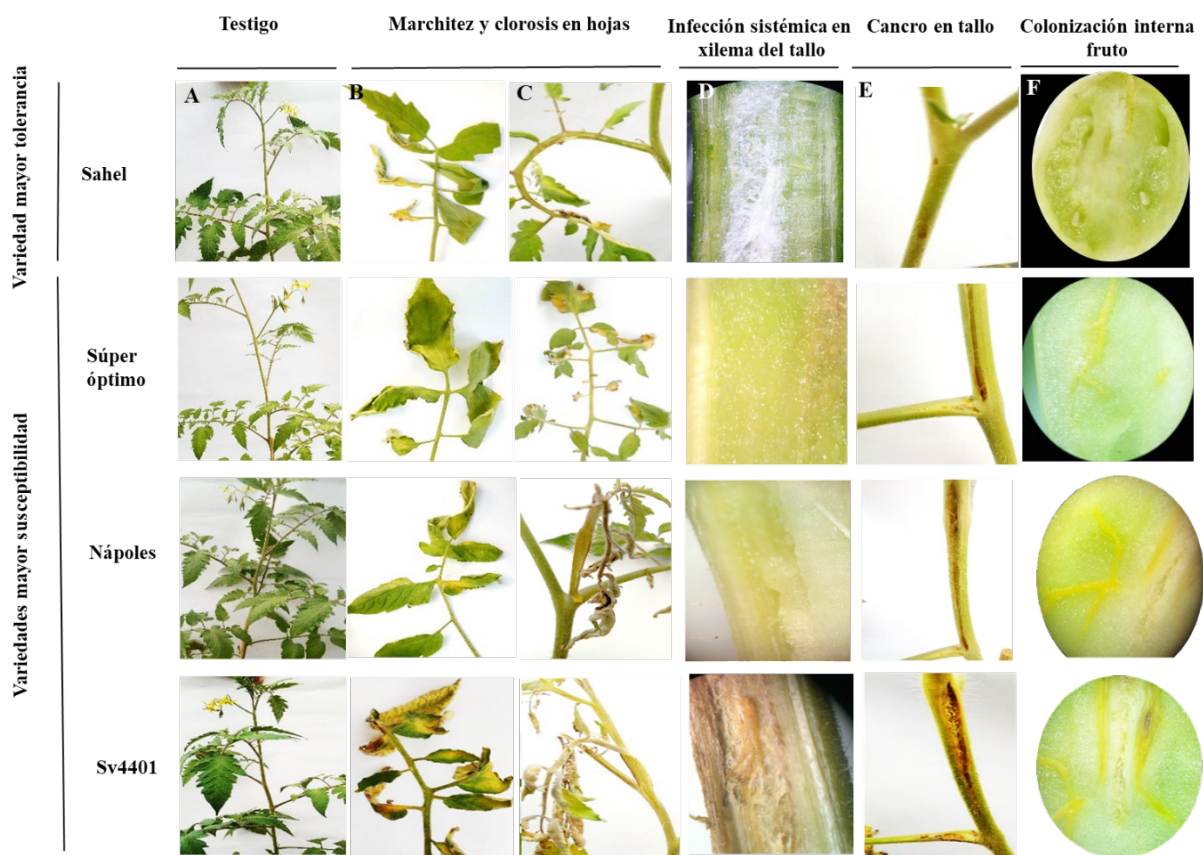


Figure 1. Severity of symptoms developed 30 dai with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (strain CP_Cmm-1) in tomato varieties with greater tolerance and susceptibility: A) control, B and C) chlorosis and wilting in leaves, D) systemic infection in the stem xylem, E) canker on the stem, and F) internal fruit colonization.

Figura 1. Severidad de síntomas desarrollados a los 30 ddi con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (cepa CP_Cmm-1) en variedades de jitomate con mayor tolerancia y susceptibilidad: A) testigo, B y C) clorosis y marchitez en hojas, D) infección sistémica en el xilema del tallo, E) cancro en tallo y F) colonización interna de fruto.

susceptible ones (Figure 1). The development of the syndrome is related to the infection of highly virulent Cmm strains (Chalupowicz *et al.*, 2017), suggesting that the Cp_Cmm-1 strain, used in this study, could be found in this group.

The systemic infection, leaf wilt and chlorosis, stem canker and fruit infection were more severe in the susceptible varieties of Súper óptimo, USATX12227 and Sv4401, as opposed to the variety with the highest tolerance (Sahel), in which all symptoms were notoriously less severe and there was no fruit infection in both phenological

con mayor tolerancia (Sahel) en la cual todos los síntomas fueron notoriamente menos severos y no hubo infección de frutos en ambas etapas fenológicas. En las variedades susceptibles, el xilema del tallo mostró síntomas desde decoloración de tejidos vasculares entre amarillo, café claro y café oscuro hasta la degradación de la médula del tallo (Figura 1).

Los mecanismos moleculares relacionados con la respuesta de la planta de jitomate a la infección por Cmm son complejos y muchos aspectos actualmente no están completamente dilucidados.

stages. In the susceptible varieties, the stem xylem displayed symptoms ranging from the discoloration of vascular tissues between yellow, light brown and dark brown to the degradation of the stem pith (Figure 1).

The molecular mechanisms related to the response of the tomato plant to the infection by Cmm are complex and many aspects are not completely elucidated. Stüwe and Tiedemann *et al.* (2013) observed a greater occlusion of the xylem vessels and less tyloses in tomato varieties susceptible to Cmm. Likewise, Eichenlaub and Gatermann (2011) showed that the temperature, variety, plant age and concentration of the inoculant had an influence on the period of incubation and the severity of the disease. The systemic infection by Cmm was related to a high population density ($>10^8$ UFC g^{-1} tissue) on the infected plant (Gartemann *et al.*, 2003), the production of pectate lyase, cellulases and xylanase enzymes that degrade the xylem vessels and cause canker in the stem (Chalupowicz *et al.*, 2012; Gartemann *et al.*, 2008), the induction of proteins related to pathogenesis (PR) by the plant (Savidor *et al.*, 2012), as well as the concentration of ammonium and carboxylic acids in the fluid of the xylem in certain tomato varieties (Bialczyk *et al.*, 2004; Yadeta *et al.*, 2013), response of the plant to concentrations of ethylene induced by the infection of Cmm (Balaji *et al.*, 2008) and antimicrobial compound α -tomatine produced by the plant, which affects the growth of Cmm (Eichenlaub and Gatermann, 2011).

Previous studies with wild tomato suggest that vascular morphology is an important factor in tolerance to Cmm (Coaker *et al.*, 2004). Many of the above factors could explain the higher tolerance of the Sahel variety identified in this investigation, which stood out for the lower severity of vascular infection, stem canker and having no apparent fruit infection. Due to this, future investigations may delve further in the interaction of this variety

Stüwe y Tiedemann *et al.* (2013) observaron mayor oclusión de los vasos del xilema y menos tílides en variedades de jitomate susceptibles a Cmm. Así mismo, Eichenlaub y Gatermann (2011) demostraron que en el periodo de incubación y severidad de la enfermedad influyó la temperatura, variedad, edad de la planta y concentración del inóculo. La infección sistémica por Cmm se relacionó con alta densidad de población ($>10^8$ UFC g^{-1} tejido) en la planta infectada (Gartemann *et al.*, 2003), producción de las enzimas pectato liasa, celulasas y xilanasas que degradan las células del xilema y originan el cancro en tallo (Chalupowicz *et al.*, 2012; Gartemann *et al.*, 2008); inducción por la planta de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) (Savidor *et al.*, 2012), así como la concentración de amonio y ácidos carboxílicos en el fluido del xilema en ciertas variedades de jitomate (Bialczyk *et al.*, 2004; Yadeta *et al.*, 2013), respuesta de la planta a concentraciones de etileno inducido por la infección de Cmm (Balaji *et al.*, 2008) y a las concentraciones del compuesto antimicrobiano α -toamtina producido por la planta que afecta el crecimiento de Cmm (Eichenlaub y Gatermann, 2011).

Estudios previos con jitomate silvestre sugirieron que la morfología vascular es un factor importante en la tolerancia a Cmm (Coaker *et al.*, 2004). Muchos de los factores anteriores podrían explicar la mayor tolerancia de la variedad Sahel identificada en esta investigación, la cual destacó por la menor severidad de infección vascular, cancro en tallo y sin infección aparente en fruto. Por lo anterior, investigaciones futuras podrían profundizar en la interacción de esta variedad con Cmm y las bases genéticas de la tolerancia observada en este estudio.

Infección en fruto en variedades de jitomate

Al realizar un corte transversal del fruto, se observaron diferencias en la agresividad y severidad

with Cmm and the genetic bases of the tolerance observed in this study.

Infection in tomato variety fruits

When cutting the fruit transversally, differences were observed in the aggressiveness and severity of the internal colonization and infection of the fruit with more tolerance (Sahel) where the symptoms of wilt and canker were less severe and without any internal colonization of the fruit. On the other hand, the susceptible varieties (Súper óptimo, Nápoles and Sv4401) displayed a greater severity in the symptoms of wilting, damage to the xylem, canker in the stem and an extensive internal colonization of the pathogen in the fruit. The internal tissue in these fruits displayed a discoloration of vascular tissue and degradation of the pith (Figure 1).

These same colonization patterns in fruits are similar to those observed in other investigations (Tancos *et al.*, 2013). The infection of fruits is a result of the extensive colonization of Cmm in the xylem of the plant, where it is dispersed until it penetrates the peduncle and it infects fruits and seeds (de León *et al.*, 2011; Eichenlaub and Gartemann, 2011). In this investigation, in the fruits with a high internal colonization rate in the most susceptible varieties, no external symptoms were observed, making them apparently adequate for marketing. However, they represent an efficient source of inoculant for later growth seasons (Nandi *et al.*, 2018), mainly via the infected seed (de León *et al.*, 2011).

From the internal tissue of the stem with symptoms of degradation and necrosis of the xylem in each variety, we re-isolated, in pure cultivations, cultures with the same morphological characteristics as Cmm. The identity of the inoculated Cp_Cmm-1 strain was confirmed by PCR with the amplification of plasmid pCM2 with the protocol previously described (Figure 2).

de la colonización e infección interna del fruto entre la variedad con mayor tolerancia (Sahel) en donde los síntomas de marchitez y cancro fueron menos severos y sin colonización interna del fruto; en contraste, en las variedades susceptibles (Súper óptimo, Nápoles y Sv4401) se observó mayor severidad de los síntomas de marchitez, daño en el xilema, cancro en tallo y una extensiva colonización interna del patógeno en el fruto. El tejido interno en estos frutos mostró decoloración de tejido vascular y degradación de la médula (Figura 1).

Estos mismos patrones de colonización en fruto son similares con los observados en otras investigaciones (Tancos *et al.*, 2013). La infección en frutos es resultado de la extensiva colonización de Cmm en el xilema de la planta de donde se dispersa hasta ingresar a través del pedicelo e infectar frutos y semillas (de León *et al.*, 2011; Eichenlaub y Gartemann, 2011). En esta investigación, en los frutos con alta colonización interna en las variedades más susceptibles no se observaron síntomas externos, aparentemente aptos para su comercialización; sin embargo, representan una eficiente fuente de inóculo para sucesivas estaciones de crecimiento (Nandi *et al.*, 2018), principalmente a través de la semilla infectada (de León *et al.*, 2011).

Del tejido interno del tallo con síntomas de degradación y necrosis del xilema de cada variedad, se re-aislaron en cultivo puro colonias con las mismas características morfológicas de Cmm. La identidad de la cepa Cp_Cmm-1 inoculada se confirmó por PCR con la amplificación del plásmido pCM2 con el protocolo previamente descrito (Figura 2).

Sensibilidad *in vitro* a bactericidas

Los resultados de la sensibilidad de la cepa CP_Cmm-1 a los bactericidas evaluados mostraron diferencias significativas (*= $p \leq 0.05$) con las formulaciones de Sulfato de estreptomycin + Oxite-traciclina + Sulfato tribásico de cobre monohidra-

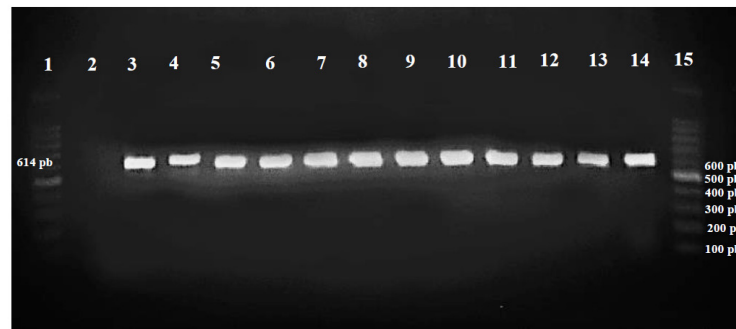


Figure 2. Amplification of the plasmid pCM2 -1 by PCR of the Cp_Cmm-1 strain inoculated in 10 tomato varieties. Lines: 1: 100pb molecular marker, 2: control (-), 3: control (+) 14: control (+), 4: Benedetti, 5: Reserva, 6: Malvia, 7: USATX12227, 8: Sahel, 9: Pai-Pai, 10: Súper óptimo, 11: Nápoles, 12: Sv4401, 13: Tobalá and 15: 100pb molecular marker.

Figura 2. Amplificación del plásmido pCM2 -1 por PCR de la cepa Cp_Cmm-1 inoculada en 10 variedades de jitomate. Líneas: 1: marcador molecular de 100pb, 2: control (-), 3: control (+) 14: control (+), 4: Benedetti, 5: Reserva, 6: Malvia, 7: USATX12227, 8: Sahel, 9: Pai-Pai, 10: Súper óptimo, 11: Nápoles, 12: Sv4401, 13: Tobalá y 15: marcador molecular de 100pb.

Sensitivity *in vitro* to bactericides

The results of the sensitivity of the Cp_Cmm-1 strain to the evaluated bactericides displayed significant differences ($*= p \leq 0.05$) with the Streptomycin sulfate + Oxytetracycline + tribasic copper sulfate monohydrate (Cuprimycin 500) and Kasugamycin (Kasumin) formulations on the reduction of cell growth. The DO values of the co-cultivation of *Clavibacter* with these bactericides were significantly lower than in the control, where normality was verified using the *Shapiro-wilks* test. The percentage of cell growth of Cmm decreased 19 and 18 % with the treatments with streptomycin sulfate + oxytetracycline + tribasic copper sulfate monohydrate (Cuprimycin 500) and kasugamycin (Kasumin) respectively, 84 h after interaction (Figure 3).

The results coincide with those by de León *et al.* (2008); Milijašević *et al.* (2009) and Werner *et al.* (2002), who reported that copper sulphate, oxytetracycline and kasugamycin is effective against Cmm and reduced the severity of foliar symptoms and damage to the fruit (Theodoro

tado (Cuprimycin 500) y Kasugamicina (Kasumin) en la reducción del crecimiento celular. Los valores de la DO del co-cultivo de *Clavibacter* con estos bactericidas fueron significativamente menores que el testigo, donde se verificó la normalidad con la prueba de *Shapiro-wilks*. El porcentaje de crecimiento celular de Cmm decreció 19 y 18 % con los tratamientos: sulfato de estreptomicina + oxitetraciclina + sulfato tribásico de cobre monohidratado (Cuprimycin 500) y kasugamicina (Kasumin) respectivamente a las 84 h de interacción (Figura 3).

Los resultados coinciden con de León *et al.* (2008); Milijašević *et al.* (2009) y Werner *et al.* (2002); quienes reportan que el sulfato de cobre, oxitetraciclina y kasugamicina es efectivo contra Cmm y redujo la severidad de los síntomas foliares y daño al fruto (Theodoro y Maringoni, 2000). Actualmente el uso de bactericidas en la agricultura es limitado; las aplicaciones de cobres y antibióticos, principalmente la estreptomicina y oxitetraciclina, están autorizados solo para algunos cultivos en muchos países y se ha demostrado la generación de resistencia por Cmm (Lyu *et al.*, 2019; Valenzuela *et al.*, 2019). La kasugamicina solo se usa en la

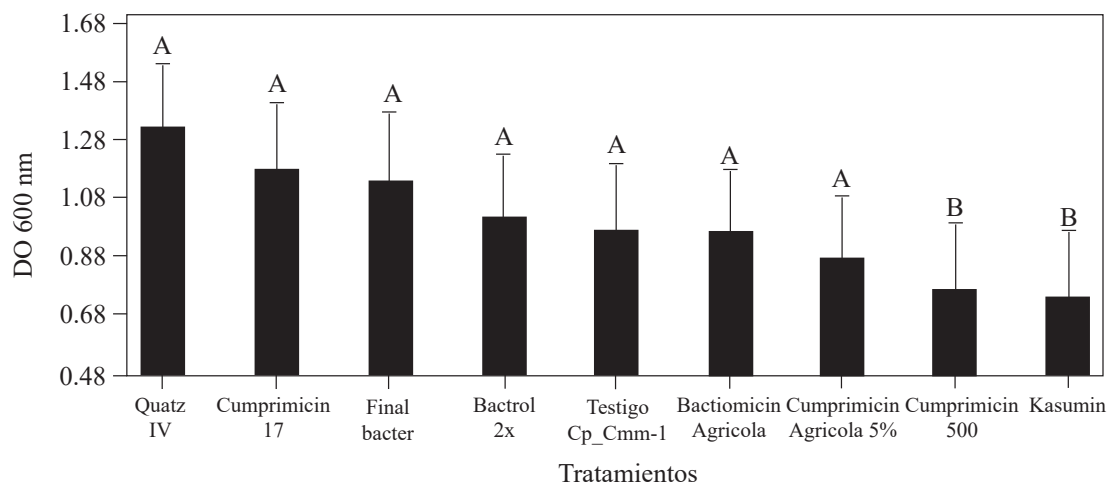


Figure 3. Sensitivity *in vitro* to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strain CP_Cmm-1 bactericides. Interaction of the co-cultivation with bactericides after 84 h at 28 °C. Readings of the density of cell growth, absorbance 600 nm (DO). Means with a common letter are not significantly different (*= $p \leq 0.05$).

Figura 3. Sensibilidad *in vitro* a bactericidas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* cepa CP_Cmm-1. Interacción del co-cultivo con bactericidas a las 84 h a 28 °C. Lecturas de la densidad de crecimiento celular, absorbancia 600 nm (DO). Medias con una letra común no son significativamente diferentes (*= $p \leq 0.05$).

and Maringoni, 2000). Nowadays, the use of bactericides in agriculture is limited, the use of coppers and antibiotics, mainly streptomycin and oxytetracycline, are only authorized for some crops in many countries, and the generation of resistance by Cmm has been proven (Lyu *et al.*, 2019; Valenzuela *et al.*, 2019). Kasugamycin is only used in agriculture and its spectre is reduced (Sundin *et al.*, 2016). Likewise, other investigations have displayed that kasugamycin reduces the populations of vascular bacterial pathogens (Dias *et al.*, 2019; McGhee and Sundin, 2011). Streptomycin has been used to control bacterial diseases in Mexico, reducing the secondary dispersion of inoculant (Félix-Gastélum *et al.*, 2012). The best Cmm control strategy in tomato is based mainly on strict preventive measures and cultural practices that include the use of less susceptible varieties, certified seed, healthy seedlings, the disinfection of tools and greenhouses, and the use of bactericides that reduce the secondary inoculant of the pathogen (de

agricultura y su espectro es reducido (Sundin *et al.*, 2016); así mismo, en otras investigaciones se ha evidenciado que la kasugamicina reduce las poblaciones de patógenos bacterianos vasculares (Dias *et al.*, 2019; McGhee y Sundin, 2011). La estreptomycin ha sido usada para el control de enfermedades bacterianas en México disminuyendo la dispersión secundaria de inóculo (Félix-Gastélum *et al.*, 2012). La mejor estrategia de control de Cmm en jitomate se basa principalmente en estrictas medidas preventivas y prácticas culturales que incluyen el uso de variedades menos susceptibles, semilla certificada, plántula sana, desinfección de herramientas e invernaderos y manejo con bactericidas que disminuyan el inóculo secundario del patógeno (de León *et al.*, 2011; EFSA, 2014; Sundin *et al.*, 2016). Los resultados de esta investigación sugieren que la combinación del uso de la variedad Sahel, la kasugamicina, en conjunto con las medidas de manejo anteriores podría ser una estrategia útil para reducir el daño causado por Cmm.

León *et al.*, 2011; EFSA, 2014; Sundin *et al.*, 2016). The results of this investigation suggest that the combined use of the Sahel variety, kasugamycin, along with the above measures could be a useful strategy to reduce the damage caused by Cmm.

CONCLUSIONS

There is variation in the aggressiveness between the strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Chignahuapan, Puebla. The CP_Cmm-1 strain is the most aggressive of the strains isolated from the three tomato varieties. This strain was identified as *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using biochemical, serological methods and PCR, and it is sensitive to kasugamycin. No tomato varieties out of the 10 planted in this location are resistant to infection by this pathogen. Most varieties are more susceptible to infection in the initial phenological stages of the plant. Among these, there are varieties with a greater tolerance to susceptibility and infection. The Sahel variety is the most tolerant to infection in different phenological stages of the plant. The Sv4401, Nápoles and Súper óptimo varieties are the most susceptible to infection. Out of these, Sv4401 is highly susceptible in different phenological stages. The use of the Sahel variety and kasugamycin could reduce the damage caused by this pathogen.

LITERATURE CITED

- Alarcón C, Castro J, Muñoz F, Arce-Johnson P and Delgado J. 1998. Protein(s) from the gram-positive bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* induces a hypersensitive response in plants. *Phytopathology* 88: 306-310. <https://doi.org/10.1094/phyto.1998.88.4.306>
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Avello MR and Seisdedo LA. 2017. El procesamiento estadístico con R en la investigación científica. *MediSur* 15(5): 583-586. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2017000500001&lng=es&tlng=es.

CONCLUSIONES

Existe variación en la agresividad entre las cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en Chignahuapan, Puebla. La cepa CP_Cmm-1 es más agresiva entre las cepas aisladas de tres variedades de jitomate. Esta cepa se identificó como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* por métodos bioquímicos, serológicos y PCR y es sensible a la kasugamicina. Ninguna de las 10 variedades de jitomate cultivadas en esta localidad son resistentes a la infección por este patógeno. La mayoría de las variedades son más susceptibles a la infección en etapas fenológicas iniciales de la planta. Entre estas, hay variedades con mayor tolerancia y susceptibilidad a la infección; la variedad Sahel es más tolerante a la infección en distintas etapas fenológicas de la planta. Las variedades Sv4401, Nápoles y Súper óptimo son más susceptibles a la infección; entre estas, la variedad Sv4401 es altamente susceptible en diferentes etapas fenológicas. El uso de la variedad Sahel y la kasugamicina podría reducir el daño por este patógeno.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Bae C, Han SW, Song YR, Kim BY, Lee HJ, Lee JM, Yeom I, Heu S and Oh CS. 2015. Infection processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops. *Theoretical and Applied Genetics* 128(7): 219-229. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2521-1>
- Balaji V, Mayrose M, Sherf O, Jacob-Hirsch J, Eichenlaub R, Iraki N, Manulis-Sasson S, Rechavi G, Barash I and Sessa G. 2008. Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiology* 146:1797-1809. <https://doi.org/10.1104/pp.107.115188>
- Bialczyk J, Lechowski Z and Dziga D. 2004. Composition of the xylem sap of tomato seedlings cultivated on media with HCO<sup>3-</sup> and nitrogen source as NO<sup>3-</sup> or NH<sup>4+</sup>. *Plant and Soil* 263(1): 265-272. <https://doi.org/10.1023/b:plso.0000047739.11698.ca>

- Borboa-Flores J, Rueda Puente EO, Acedo Félix E, Ponce JF, Cruz M, Grimaldo JO and García Ortega, AM. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32(4): 319-326. <https://doi.org/10.35196/rfm.2009.4.319-326>
- Chalupowicz L, Zelleremann EM, Fluegel M, Dror O, Eichenlaub R, Gartemann KH, Savidor A, Sessa G, Iraki N, Barash I and Manulis-Sasson S. 2012. Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology* 102(1): 23-31. <https://doi.org/10.1094/phyto-05-11-0135>
- Chalupowicz L, Barash I, Reuven M, Dror O, Sharabani G, Gartemann KH, Eichenlaub R, Sessa G and Manulis-Sasson S. 2017. Differential contribution of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* virulence factors to systemic and local infection in tomato. *Molecular Plant Pathology* 18: 336-346. <https://doi.org/10.1111/mpp.12400>
- Coaker GL, Willard B, Kinter M, Stockinger EJ and Francis DM. 2004. Proteomic analysis of resistance mediated by Rcm 2.0 and Rcm 5.1, two loci controlling resistance to bacterial canker of tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(9): 1019-1028. <https://doi.org/10.1094/mpmi.2004.17.9.1019>
- Croce V, Pianzola MJ, Durand K, González-Arcos M, Jacques MA and Siri MI. 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. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0738-0>
- de León L, Siverio F, López MM and Rodríguez A. 2008. Comparative efficiency of chemical compounds for in vitro and in vivo activity against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of tomato bacterial canker. *Crop Protection* 27(9): 1277-1283. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.04.004>
- de León L, Siverio F, López MM and Rodríguez A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Disease* 95(11): 1328-1338. <https://doi.org/10.1094/pdis-02-11-0091>
- Dias VD, Carrer Filho R and Cunha MGD. 2019. Comparison of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* molecular detection in heat-treated sugarcane setts1. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 49. <https://doi.org/10.1590/1983-40632019v4955132>
- Dreier J, Meletzus D and Eichenlaub R. 1997. Characterization of the plasmid encoded virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10(2): 195-206. <https://doi.org/10.1094/mpmi.1997.10.2.195>
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health). 2014. Scientific Opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. *EFSA Journal*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3721>
- Eichenlaub R and Gartemann KH. 2011. The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual review of phytopathology* 49:445-464. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095258>
- EPO. 2016. PM 7/42 (3) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *EPO Bulletin* 46: 202-225. <https://doi.org/10.1111/epp.12302>
- Félix-Gastélum R, Maldonado-Mendoza IE, Espinoza-Mancillas MG, Leyva-López NE, Martínez-Valenzuela C, Martínez-Alvarez JC and Herrera-Rodríguez G. 2012. Halo-spot and external stem necrosis of tomato caused by *Pseudomonas syringae* in Sinaloa, Mexico. *Phytoparasitica* 40(4): 403-412. <https://doi.org/10.1007/s12600-012-0242-4>
- Gartemann KH, Kirchner O, Engemann J, Grafen I, Eichenlaub R and 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. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.07.011>
- Gartemann KH, Abt B, Bekel T, Burger A, Engemann J, Flügel M, Gaigalat L, Goesmann A, Gräfen I, Kalinowski J, Kaup O, Olaf Kaup, Kirchner O, Krause L, Linke B, Burkhard Linke, McHardy A, Meyer F, Pohle S, Rückert C, Schneider S, Zelleremann EM, Pühler A, Eichenlaub R, Kaiser O and Bartels D. 2008. The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *Journal of Bacteriology* 190: 2138-2149. <https://doi.org/10.1128/jb.01595-07>
- Gleason ML, Gitaitis RD and Ricker MD. 1993. Recent progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. *Plant Disease* 77: 1069-1076. <https://doi.org/10.1094/pd-77-1069>
- Huang R and Tu JC. 2001. Effects of nutrient solution pH on the survival and transmission of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in hydroponically grown tomatoes. *Plant Pathology* 50(4): 503-508. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00586.x>
- INFOSTAT. 2003. InfoStat version 1.5. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 232 p.
- Jung WJ, Mabood F, Souleimanov A, Whyte LG, Niederberger TD and Smith DL. 2014. Antibacterial activity of antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* DJM-51 against phytopathogenic *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* ATCC 7429 *in vitro*. *Microbial Pathogenesis* 77: 13-16. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2014.10.008>
- Kabas A, Boyacı HF, Horuz S, Aysan Y and İlbi H. 2018. Investigation on identification of new resistant resources to bacterial canker and wilt disease. *Feb-Fresenius Environmental Bulletin*, 8498.
- Klement Z, Mavridis A, Rudolph K, Vidaver A, Perombelon MCM, Moore LW and Rudolph K. 1990. Inoculation of plant tissue. *In: Klement Z, Rudolph K, Sands DC.* (Eds.), *Methods in Phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapest, pp. 99-100.
- Lelis FMV, Czajkowski R, de Souza RM, Ribeiro D H and van der Wolf J M. 2014. Studies on the colonization of axenically grown tomato plants by a GFP-tagged strain of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *European Journal of Plant pathology* 139(1): 53-66. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0362-9>
- Lu Y, Hatsugai N, Katagiri F, Ishimaru CA and Glazebrook J. 2015. Putative serine protease effectors of *Clavibacter*

- michiganensis* induce a hypersensitive response in the apoplast of *Nicotiana* species. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28(11): 1216-1226. <https://doi.org/10.1094/mpmi-02-15-0036-r>
- Lyu Q, Bai K, Kan Y, Jiang N, Thapa SP, Coaker G, Li J and Luo L. 2019. Variation in Streptomycin Resistance Mechanisms in *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology* 109(11): 1849-1858. <https://doi.org/10.1094/phyto-05-19-0152-r>
- Martínez-Castro E, Jarquín-Gálvez R, Alpuche-Solís, Vallejo-Pérez MR, Colli-Mull JG and Lara-Ávila JP. 2018. Bacterial wilt and canker of tomato: fundamentals of a complex biological system. *Euphytica* 214: 72. <https://doi.org/10.1007/s10681-018-2140-4>
- McFarland J. 1907. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA* XLIX: 1176-1178.
- McGhee GC and Sundin GW. 2011. Evaluation of kasugamycin for fire blight management, effect on nontarget bacteria, and assessment of kasugamycin resistance potential in *Erwinia amylovora*. *Phytopathology* 101(2): 192-204. <https://doi.org/10.1094/phyto-04-10-0128>
- Milijašević S, Todorović B, Potočnik I, Rekanović E and Stepanović M. 2009. Effects of copper-based compounds, antibiotics and a plant activator on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in greenhouse tomato seedlings. *Pesticidi i Fitomedicina* 24(1): 19-27. <https://doi.org/10.2298/pif0901019m>
- Mirzaee H, Peralta NLN, Carvalhais LC, Dennis PG and Schenk PM. 2021. Plant-produced bacteriocins inhibit plant pathogens and confer disease resistance in tomato. *New Biotechnology* 63: 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2021.03.003>
- Muhammad S, Naseerud D, Musharaf A, Ali A, Ishrat N, Alam SS and Najeeb U. 2020. Bioefficacy of some aqueous phytoextracts against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith), the cause of bacterial canker of tomato. *Gesunde Pflanzen* 72(3): 207-217. <https://doi.org/10.1007/s10343-020-00503-9>
- Nandi M, Macdonald J, Liu P, Weselowski B and Yuan ZC. 2018. *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management. *Molecular Plant Pathology* 19(8): 2036-2050. <https://doi.org/10.1111/mpp.12678>
- SADER, 2020. El jitomate, hortaliza mexicana de importancia mundial. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Fecha de publicación 10 de octubre de 2020. <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/el-jitomate-hortaliza-mexicana-de-importancia-mundial?idiom=es>
- Savidor A, Teper D, Gartemann KH, Eichenlaub R, Chalupowicz L, Manulis-Sasson S, barash I, Tews H, Mayer K, Giannone RJ, Hettich RL and Seesa G. 2012. The *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*-tomato interactome reveals the perception of pathogen by the host and suggests mechanisms of infection. *Journal of Proteome Research* 11(2): 736-750. <https://doi.org/10.1021/pr200646a>
- Schaad NW, Jones JB and Chun W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd edn. St Paul, MN, USA: APS.
- Sharabani G, Manulis-Sasson S, Borenstein M, Shulhani R, Lofthouse M, Chalupowicz L and Shtienberg D. 2013a. The significance of guttation in the secondary spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato greenhouses. *Plant Pathology* 62(3): 578-586. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02673.x>
- Sharabani G, Shtienberg D, Borenstein M, Shulhani R, Lofthouse M, Sofer ML, Chalupowicz Barela V and Manulis-Sassona S. 2013b. Effects of plant age on disease development and virulence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato. *Plant Pathology* 62(5): 1114-1122. <https://doi.org/10.1111/ppa.12013>
- Steiner AA. 1984. The universal nutrient solution. In: *Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture*. International Society for Soilless Culture (ed.), Lunteren, Netherlands. pp:633-649.
- Stüwe B and von Tiedemann A. 2013. Bacterial canker of tomatoes-histological characterization of cultivar resistance and seed transmission. *Journal of Plant Disease and Protection* 120(5-6): 194-200. <https://doi.org/10.1007/bf03356474>
- Sundin GW, Castiblanco LF, Yuan X, Zeng Q and Yang CH. 2016. Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects: challenges in bacterial molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 17(9): 1506-1518. <https://doi.org/10.1111/mpp.12436>
- Tancos MA, Chalupowicz L, Barash I, Manulis-Sasson S and Smart CD. 2013. Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes. *Applied and Environmental Microbiology* 79(22): 6948-6957. <https://doi.org/10.1128/aem.02495-13>
- Thapa SP, Pattathil S, Hahn MG, Jacques MA, Gilbertson RL and Coaker G. 2017. Genomic analysis of *Clavibacter michiganensis* reveals insight into virulence strategies and genetic diversity of a Gram-positive bacterial pathogen. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 30: 786-802. <https://doi.org/10.1094/mpmi-06-17-0146-r>
- Theodoro G and Maringoni AC. 2000. *In vitro* and *in vivo* action of chemicals on *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, causal agent of the bacterial canker of tomato. *Scientia Agricola* 57: 439-443. <https://doi.org/10.1590/s0103-90162000000300011>
- Thyr BD. 1968. Resistance to bacterial canker in tomato, and its evaluation. *Phytopathology* 58: 279-81.
- Valenzuela M, Méndez V, Montenegro I, Besoain X and Seeger M. 2019. Streptomycin resistance in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from Chile is related to an rpsL gene mutation. *Plant Pathology* 68(3): 426-433. <https://doi.org/10.1111/ppa.12971>
- van Steekelenburg NAM. 1985. Resistance to *Corynebacterium michiganense* in tomato genotypes. *Euphytica* 34(2): 245-250. <https://doi.org/10.1007/bf00022916>
- Wassermann E, Montecchia MS, Garaventa VS, Correa OS and Romero AM. 2020. Virulence and pCM1 plasmid carriage are related to BOX-PCR fingerprint type in strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* that cause bacterial wilt and canker of tomato in Argentina. *Plant Pathology* 69(4): 723-732. <https://doi.org/10.1111/ppa.13163>

Werner NA, Fulbright DW, Podolsky R, Bell J and Hausbeck MK. 2002. Limiting populations and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on seedling tomatoes in the greenhouse. Plant Disease 86: 535-542. <https://doi.org/10.1094/pdis.2002.86.5.535>

Yadeta K and Thomma B. 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. Frontiers in Plant Science 4: 97. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00097>  
Yuqing W, Zhang Y, Zhipeng G and Wencai Y. 2018. Breeding for resistance to tomato bacterial diseases in China: challenges and prospects. Horticultural Plant Journal 4(5): 193-207. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2018.08.004>