

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS



Fitocompatibilidad de Nanomateriales Modificados Con Sondas De ADN Como Soporte Para Biosensores Luminiscentes De Bacterias

Por:

JESÚS RICARDO CHARLES FLORES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2021.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Fitocompatibilidad de Nanomateriales Modificados Con Sondas De ADN Como
Soporte para Biosensores Luminiscentes De Bacterias

Por:

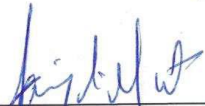
JESÚS RICARDO CHARLES FLORES

TESIS

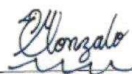
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Asesoría:




Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
Asesor Principal Interno



Dr. Gonzalo Ramírez García
Asesor Principal Externo




Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Co-Asesor



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Co-Asesor





M.C. Sergio Sánchez Martínez
Coordinador de la División de Ingeniería

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2021.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS

Fitocompatibilidad de Nanomateriales Modificados Con Sondas De ADN Como
Soporte para Biosensores Luminiscentes De Bacterias

Por:

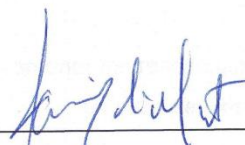
JESÚS RICARDO CHARLES FLORES

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

Aprobada por el Comité de Evaluación:




Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo
Presidente



Dr. Gonzalo Ramírez García
Secretario



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez
Sinodal



Dr. Marco Adán Juárez Verdayes
Sinodal

Saltillo, Coahuila, México

Junio, 2021.

Declaración de no plagio

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliográficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

Por lo anterior me responsabilizo de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaro que este trabajo es original.

Pasante de Ingeniero en Biotecnología



Jesús Ricardo Charles Flores

Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios, por darme la vida y la fortaleza para culminar mi formación profesional.

A mis padres, al Ing. Jesús Eduardo Charles Zamora y la Sra. María Magdalena Flores Ramírez, por todo el apoyo incondicional que me han otorgado durante mi formación profesional y personal.

Al amor de mi vida, por darme esperanza y tranquilidad cuando más lo necesito.

Te dedico mi trabajo profesional, como homenaje a nuestro amor.

Andrea Cortés Jasso.

A mi hermano Eduardo Azael, por su apoyo.

A mi Alma Mater, por ser un santuario del conocimiento.

A mis asesores al Dr. Gonzalo Ramírez y Dr. Javier Montalvo por otorgarme conocimiento y apoyo para el desarrollo de mi trabajo.

A mis amigos que me acompañaron y me apoyaron durante mi formación, Claudio Cándido, Saul Carnevalli, Alberto Almanza, Emiliano Treviño, Rogelio Zapata y Miguel Obregón.

Agradecimientos institucionales

Los autores de este trabajo titulado: “***Fitocompatibilidad de nanomateriales modificados con sondas de ADN como soporte para biosensores luminiscentes de bacterias***”, agradecemos el apoyo y soporte brindado por las siguientes personas e instituciones, necesario para la realización de este trabajo de obtención de grado de **Ingeniería en Biotecnología**:

- ❖ Al **Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la Universidad Nacional Autónoma de México**, por su infraestructura y facilidades para la realización de este trabajo.
- ❖ Al Departamento de Ciencias Básicas por permitirme cursar y concluir mis estudios profesionales.
- ❖ Al **Laboratorio Nacional de Materiales Grafénicos**, CIQA.
- ❖ Al proyecto interno CIQA-2020, No. 6567.
- ❖ A la **Dra. Ileana Vera Reyes**, el Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez y al Dr. Marco Adán Juárez Verdayes por discusiones fructíferas para este trabajo.
- ❖ Al **M.C. Manuel Aguilar Franco**, del Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada de la UNAM, por su apoyo técnico para la preparación y análisis de muestras mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido (STEM),
- ❖ Al **Dr. Uriel Alejandro Sierra**, del Centro de Investigación en Química Aplicada, por su apoyo en la caracterización fisicoquímica de los materiales presentados en este trabajo.
- ❖ A la **Ing. Lourdes Palma Tirado**, del Instituto de Neurobiología de la UNAM, por su apoyo técnico para la preparación y análisis de muestras mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- ❖ A la **Dra. Irene Castaño Navarro**, la **Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**, y al **Dr. Alejandro De Las Peñas Nava** de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, por su valiosa contribución en el desarrollo de BESTur.

Con inmensa gratitud,

El sustentante: **Jesús Ricardo Charles Flores**

Los directores de tesis:

Dr. Javier Israel Montalvo Arredondo

Dr. Gonzalo Ramírez García

***“Cada día sabemos más
y entendemos menos”.***

Albert Einstein

Índice General de Contenido

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
I.- PRÓLOGO.....	IX
II.- INTRODUCCIÓN	1
III. OBJETIVOS	3
3.1- Objetivo general:	3
3.2.- Objetivos específicos:.....	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1.- Patogénesis de <i>Clavibacter michiganensis</i> en cultivos agrícolas	4
4.2.- Incidencia de afectación en tomate.	6
4.3.- Métodos convencionales de detección de <i>Clavibacter Michiganensis</i>	8
4.4.- Nanobiosensores en la Agricultura.....	10
4.5.- Nanosensores basados en efectos ópticos	14
4.6.- Partículas metálicas y nanoplasmónica.....	14
4.7.- Nanopartículas de Conversión Ascendentes (UPNPs).....	16
4.8.- Bioreceptores como elementos de selectividad.....	16
4.9.- Biosensores basados en secuencias de nucleótidos (ADN y ARN)	18
4.10.- Trabajos previos para <i>Clavibacter michiganensis</i>	20
4.11- Recursos bioinformáticos	21

4.12.- Identificación de regiones únicas del genoma de <i>Clavibacter michiganensis</i> .	
22	
V.- MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1.- Síntesis de nanomateriales.....	26
5.1.1.- Síntesis de nanopartículas de oro (AuNSs) mediante método de Turkevich.	
26	
5.1.2.-Síntesis de nanopartículas de oro en forma de estrella (AuNSt).....	27
5.1.3.-Síntesis de nanopartículas con luminiscencia por conversión ascendente (UCNPs).	27
5.1.4.-Síntesis de UCNPs-ZrO ₂	28
5.2.- Caracterización fisicoquímica de los nanomateriales.....	29
5.2.1.- Espectroscopía UV-Vis.....	29
5.2.2.- Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).....	29
5.2.3.- Microscopía electrónica de transmisión y barrido (STEM)	29
5.2.4.- Espectroscopía de fluorescencia.....	29
5.3.- Identificación de las regiones únicas del genoma de <i>Clavibacter michiganensis</i> .	
30	
5.3.1.- Diseño de la sonda y síntesis de sondas	30
VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
6.1.- Síntesis y caracterización de las nanopartículas desarrolladas en este trabajo.....	32

6.2.- Identificación de las regiones únicas del genoma de <i>Clavibacter michiganensis</i>	43
VII.- CONCLUSIONES.....	49
VIII.- LITERATURA.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sintomatologías causadas por <i>Cmm</i> en tomate.....	5
Figura 2. Figura 2. Distribución mundial de <i>Cmm</i>	7
Figura 3. Aplicación de los nanosensores en la agricultura.....	11
Figura 4. Principales componentes de un nano-biosensor.....	12
Figura 5. Representación esquemática de un plasmón de resonancia de superficie localizado.....	15
Figura 6. Elementos de reconocimiento de biomoléculas.....	18
Figura 7. Diseño general de un biosensor de ADN.....	20
Figura 8. Síntesis de AuNSs mediante el método de Turkevich modificado.	26
Figura 9. Fotografía de las suspensiones de a) AuNSp, b) AuNSt, c) UCNP-ZrO ₂ . 33	
Figura 10. Espectros de absorbancia UV-Vis de las nanopartículas sintetizadas. 33	
Figura 11.. Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido (STEM) de A) Nanopartículas esféricas de oro (AuNSs), B) Nanopartículas de oro en forma de estrella (AuNSt).	34
Figura 12. Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido A) Nanopartículas con emisiones por conversión ascendente, B) Nanopartículas con emisiones por conversión ascendente y coraza de ZrO ₂	34
Figura 13. Espectros de FTIR de las nanopartículas sintetizadas.	36
Figura 14. Representación esquemática de la luminiscencia de las UCNP.....	39
Figura 15. Esquema general de la síntesis de las UCNP-ZrO ₂ funcionalizadas con sondas de ADN.....	40

Figura 16.. a) Espectro de emisión de las UCNPs-ZrO ₂ sintetizadas, b) espectro electromagnético visible, y c) espectro de emisión de las UCNPs-ZrO ₂ después de ser excitadas con luz de 975 nm.....	41
Figura 17. Planta de jitomates para prueba de concepto de escaneo de nanopartículas luminiscentes.....	42
Figura 18. Escaneo de las UCNPs-ZrO ₂ -ADN en las diferentes partes de la planta de jitomate.....	42
Figura 19 Porcentaje de fragmentos absorbidos obtenidos con diferentes valores de los parámetros IDENT y QCOV.	44
Figura 20. Número de fragmentos ensamblados obtenidos usando diferentes parámetros de IDENT y QCOV.....	45
Figura 21. Tamaño de los fragmentos ensamblados obtenidos usando diferentes valores de los parámetros IDENT y QCOV.	45
Figura 22. . Tamaño de los fragmentos ensamblados y número de fragmentos obtenidos en función del número de fragmentos no absorbidos.....	46
Figura 23. Mapeo de las regiones únicas del genoma de <i>Clavibacter michiganensis</i> identificadas con BESTur usando los parámetros 60% de identidad y 20% de cobertura HSP (C) y 40% de cobertura HSP (D).....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cultivos hospederos de Cmm	6
Tabla 2. Elementos de reconocimiento de biomoléculas.	17

I.- PRÓLOGO

Han transcurrido cinco años, desde que presente mi examen de admisión para la carrera de ingeniero en Biotecnología. Durante este tiempo, comprendí que la verdadera esencia de mi carrera es innovar en las tecnologías existentes para facilitar miles de tareas cotidianas de manera precisa y sustentable.

La biotecnología contribuye de manera contundente en los agro-sistemas mexicanos. De ese modo, el presente trabajo podría ser de gran relevancia para el futuro de los dispositivos de diagnóstico de enfermedades causadas por fitopatógenos, que actualmente son responsables de grandes pérdidas al agricultor.

Lamentablemente, debido a la situación sanitaria (SARS - COVID 2019) que vive el mundo a partir de la primavera del año 2020, el proyecto de investigación se limitó solamente a sentar las bases para el desarrollo del biosensor. Sin embargo, los nanomateriales desarrollados y descritos en esta tesis han mostrado un gran potencial y compatibilidad con las plantas, dejando las puertas abiertas para futuros desarrollos agro-nanotecnológicos multidisciplinarios.

De antemano me siento satisfecho por haber adquirido conocimiento y poder colaborar con dos grandes investigadores. De igual manera, la investigación supero mis expectativas y motivó aún más en mi un espíritu de investigador.

II.- INTRODUCCIÓN

La nanotecnología, ha contribuido a la creación de nuevos artefactos tecnológicos, los cuales han facilitado miles de tareas. Una contribución de la nanotecnología, son los biosensores, los cuales han tenido una amplia gama de aplicaciones como la medicina, en ciencias ambientales, agricultura, entre otras.

En el presente trabajo, se aborda uno de los grandes problemas que vive la agricultura, el diagnóstico de enfermedades, causadas por microorganismos fitopatógenos. Dichas enfermedades causan grandes pérdidas monetarias al productor, inducen el incremento del precio del producto, y, en consecuencia, dificultan la tarea de satisfacer la demanda de alimentos que hay en el mundo. Actualmente, existen innumerables factores que influyen en los resultados en los métodos de diagnóstico convencionales, y por tal motivo, se encuentra una gran dificultad para erradicar dichas enfermedades.

El chancro bacteriano (cancro, o marchitez bacteriana), causado por la bacteria *Clavibacter michiganensis spp michiganensis (Cmm)*, es una enfermedad que trae consecuencias irreparables para el cultivo de tomate. Por lo tanto, en este trabajo se proponen nuevos nanomateriales fotoactivos modificados con sondas de ADN como soporte de biosensores de bacterias fitopatógenas.

Los nanomateriales propuestos, cuentan con características muy diferentes entre sí. Por ejemplo, su tamaño, forma (esférica y estrella), su capacidad de respuesta ante la excitación luminosa, etc. Las nanopartículas (NPs) sintetizadas en este trabajo son: AuNSp (nanopartículas esféricas de oro), Nanopartículas de oro en forma de estrellas (AuNSt), y nanopartículas con emisiones por conversión ascendente con una coraza de zirconia (UCNPs-ZrO₂). Las NPs de oro tienen la capacidad de intensificar las señales de los analitos mediante el análisis por espectroscopía Raman, mientras que las UCNPs presentan un tipo especial de luminiscencia capaz de ser observado aún en interacción con diversos sustratos, y de manera particular

para este proyecto, con las plantas y sus partes. La coraza de ZrO_2 alrededor de las UCNPs permite su acoplamiento sencillo con diversas moléculas específicas como el ADN, mediante su interacción con el grupo fosfato presente en su esqueleto estructural.

Además, el presente trabajo incluye el diseño de sondas de ADN muy específicas para *Clavibacter michiganensis* mediante el análisis de grandes volúmenes de bases de datos de secuencias biológicas con el empleo de la herramienta bioinformática BESTur. Dicha herramienta tiene la capacidad de identificar regiones únicas en el genoma del patógeno mediante la comparación sistemática de éste con un conjunto de genomas de diferentes especies pero que comparten un nicho común en el medio ambiente. Estas regiones únicas son secuencias en el genoma del patógeno que no se encuentran en los genomas de las especies analizadas o que son muy disimilares entre sí. Estas regiones son por lo tanto un blanco para diseñar oligonucleótidos cebadores o sondas que nos van a permitir identificar el patógeno de manera específica en muestras biológicas mediante el empleo de técnicas basadas en ADN. El acoplamiento de dichas sondas específicas y selectivas de oligonucleótidos con las nanopartículas fotoactivas, se abre el panorama para el desarrollo de nuevos nano-biosensores muy sensibles y específicos, capaces de detectar diversos microorganismos de relevancia agrícola, que en este caso será *Clavibacter michiganensis*.

III. OBJETIVOS

3.1- Objetivo general:

Sintetizar nanomateriales fotoactivos y diseñar sondas de ADN para el desarrollo de biosensores de bacterias fitopatógenas como *Clavibacter michiganensis*.

3.2.- Objetivos específicos:

-
- Sintetizar y caracterizar diversas nanopartículas fotoactivas: AuNSp, AuNSt y UCNPs-ZrO₂.
- Acoplar la sonda desarrollada y las nanopartículas sintetizadas.
- Verificar la capacidad de obtener señales luminiscentes de las nanopartículas en interacción directa con diversas partes de las plantas de tomate.
- Identificar las regiones únicas en el genoma de *Clavibacter michiganensis* y diseñar la sonda en las regiones seleccionadas.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1.- Patogénesis de *Clavibacter michiganensis* en cultivos agrícolas

Según el Panorama Agroalimentario Tomate Rojo FIRA 2019, el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) ocupa el cuarto lugar de importancia en el sector agrícola del país. Entre los principales estados productores, se encuentran Sinaloa, Baja California, San Luis Potosí, Tamaulipas y Nayarit. Otros estados como Jalisco, Coahuila, Puebla, Sonora, Guanajuato, Baja California Sur y Oaxaca, han comenzado su producción a gran escala [1]. Este cultivo hortícola es susceptible a factores abióticos y bióticos, los cuales influyen en su fruto. El factor biótico es causado por diferentes agentes patógenos como los son virus, bacterias, hongos, protozoarios y nematodos. La principal enfermedad bacteriana que causa grandes pérdidas económicas es el chancro o cancro bacteriano, o marchitez bacteriana, causada por *Clavibacter michiganensis spp michiganensis (Cmm)* [2]–[5]. Los primeros reportes de esta enfermedad, lo realizó Edwin F. Smith en 1910 en la ciudad de Grand Rapids, Michigan, E.U.A. [4] [6]. La infección por *Cmm*, se puede producir con inóculos transportados por la semillas o heridas en el tejido vegetal, los cuales ocasionan marchitamiento de la planta. También se puede propagar la infección a través de tricomas rotos, los cuales ocasionan necrosis y formación de manchas en el fruto. Como se puede observar en la Figura 1, la sintomatología aparece en determinadas partes de la planta, y el tiempo de respuesta es muy variado. Además, influyen circunstancias como: la edad de la planta, sitio de infección, la susceptibilidad del cultivo y las condiciones ambientales. Esto ocasiona que la identificación del chancro solo con fundamento en los síntomas no suele ser muy exacta. La inducción de *Cmm* en una zona libre de la enfermedad, se realiza a través del material vegetal de reproducción el cual se convierte en el mecanismo de dispersión de larga distancia. El vector de propagación son las semillas comerciales, y las plántulas producidas en invernaderos comerciales.

Las condiciones óptimas para la proliferación de *Cmm* implican temperaturas entre 18-24° C, y una humedad relativa de 80%. Además, las plantas con un aporte excesivo de nitrógeno son susceptibles a la infección. Gracias a su persistencia y características innatas, la bacteria sobrevive entre los cultivos, restos de las plantas, en el suelo (uno o varios años), maquinas, cajas, herramientas, y en la estructura de los invernaderos. El chancro bacteriano es una enfermedad que no se mantiene constante en su tasa de infección, hay años de baja incidencia, y otros años en los cuales puede convertirse en una epidemia [7].

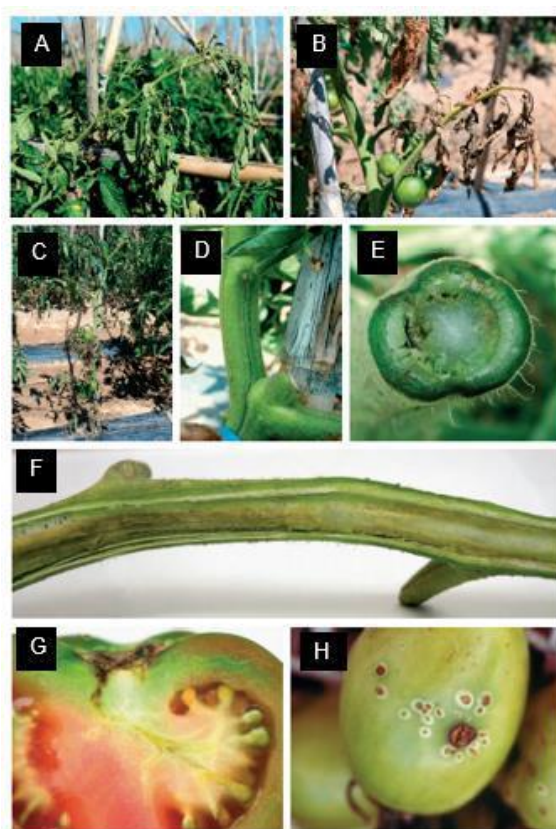


Figura 1. Sintomatologías causadas por *Cmm* en tomate. A) B) y C) marchitamiento sistemático de la planta. D) E) y F) En el interior del tallo (tejido vascular) presenta una coloración marrón rojiza, mientras que en el exterior es frecuente la formación de chancros. G) y H) En los frutos se observan manchas pequeñas (3-6 mm) de color oscuro y rodeadas con un halo blanco. En el interior el tejido vascular que conduce a la semilla, puede mostrar color amarillento o castaño.

4.2.- Incidencia de afectación en tomate.

En la siguiente tabla podemos observar la distribución de *Cmm* como hospedero en diferentes cultivos, incluyendo el tomate. Se presenta una clasificación como hospedero mayor, menor, incidental, artificial y salvaje, y se denota la relevancia de la infección en tomates. [8]

Tabla 1. Cultivos hospederos de *Cmm*

Nombre común	Nombre científico/ ID	Tipo de hospedero
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i> (LYPES)	Mayor
Sandia	<i>Citrullus lanatus</i> (CITLA)	Artificial
Pepino	<i>Cucumis sativus</i> (CUMSA)	Artificial
Girasol	<i>Helianthus annuus</i> (HELAN)	Artificial
Cebada	<i>Hordeum vulgare</i> (HORVX)	Artificial
Frijol	<i>Phaseolus vulgaris</i> (PHSVX)	Incidental
Chícharo	<i>Pisum sativum</i> (PIBSX)	Incidental
Centeno	<i>Secale cereale</i> (SECCE)	Artificial
Tomatillo del diablo	<i>Solanum nigrum</i> (SOLNI)	Salvaje/hierba
	<i>Solanum pectinatum</i> (SOLPQ)	Incidental

Naranja/lulo	<i>Solanum quitoense</i> (SOLQU)	Incidental
Sombra de hojas	<i>Solanum triflorum</i> (SOLTR)	Salvaje/hierba
Patata	<i>Solanum tuberosum</i> (SOLTU)	Desclasificado
Trigo Harinero	<i>Triticum aestivum</i> (TRZAX)	Artificial
Maíz	<i>Zea mays</i> (ZEAMX)	Incidental
Avena	<i>Avena sativa</i> (AVESA)	Artificial

Según la base de datos de EPPO (**European and Mediterranean Plant Protection Organization** <https://gd.eppo.int/taxon/CORBMI/distribution>), *Cmm* se encuentra distribuida entre los principales países productores de tomate (ver Figura 2). Además, por su causa se han registrado pérdidas significativas alrededor del mundo, como es el caso de Canadá, que registro bajas del 20% en su producción anual, Francia del 20 al 30%, Estados Unidos con el 46%, y Australia con el 10%.

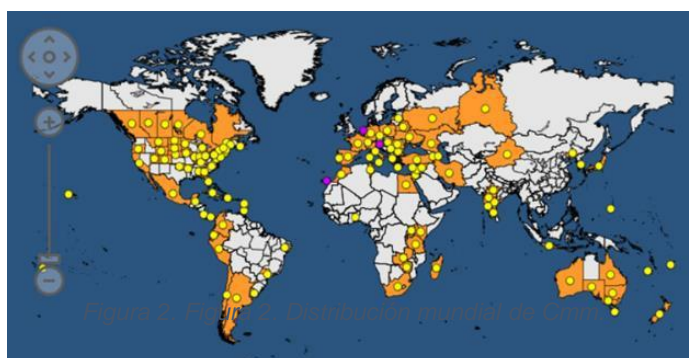


Figura 2. Distribución mundial de *Cmm*.

Los primeros casos en México se reportaron en el año de 1994, en el Valle de Culiacán. Posteriormente, *Cmm* se propagó por los principales estados productores de tomate, y en el año 2006, afectó 200 Ha en el estado de Sonora, generando pérdidas que ascendieron a 40 millones de dólares [9], [10].

Actualmente, se han desarrollado manuales de manejo y seguimiento para esta bacteria, los cuales reportan que no se ha producido una variedad resistente a dicha enfermedad. La estrategia principal para controlar la propagación de *Cmm* es: la prevención, y las principales medidas que se utilizan son las siguientes:

- Utilizar semillas o material vegetal libre de patógenos.
- Evitar el uso de abonos nitrogenados.
- Destruir las principales plantas infectadas y realizar un cerco sanitario.
- Desinfectar el material que entre en contacto con las plántulas, frutos y semillas.
- En invernaderos, utilizar ventilación y evitar el riego por aspersion.
- Incinerar todo el material vegetal que queda en el suelo posterior a la cosecha.
- Realizar rotación de cultivos con plantas no solanáceas durante al menos dos años.
- Desinfectar suelos y almacenes utilizando bromuro de metilo (BM). [4], [7].

4.3.- Métodos convencionales de detección de *Clavibacter Michiganensis*

La presencia de esta enfermedad, podría ocasionar la pérdida de hasta el 70 % de la producción. Por tal motivo, se han desarrollado técnicas de detección temprana, para evitar pérdidas económicas muy grandes. Desde la década de los ochentas, grupos de investigación han diseñado diferentes técnicas para confirmar casos de *Cmm* [9], a continuación se presenta los métodos convencionales para la detección de *Cmm*.

- **Medios de cultivo semiselectivos.**

Se han desarrollado medios de cultivo *in vitro* semiselectivos para la detección de *Cmm*, entre los cuales podemos encontrar el medio SCM, el cual puede generar resultados en una prueba de hasta 13 días. El medio D2ANX, también utilizado por investigadores o compañías de análisis de semillas. Además, el agar KBTS también permite la detección de la bacteria con tiempos de análisis de 6 días, un periodo significativamente menor al comparado con el medio SCM.

- **Ensayo de semillas.**

Con la invención de los medios semiselectivos, se pueden procesar de 10,000 a 30,000 semillas, a través de un proceso de molienda, después se mezclan con un buffer, y posteriormente se diluye en uno de los medios selectivos. Los lotes de semillas que dan positivo para el chancro generalmente se rechazan para la venta o siembra.

- **Ensayo de trasplante.**

Es un ensayo cualitativo, el cual consiste en el análisis de un tallo obtenido de los medios semiselectivos. Con ello se aspira a la detección rápida y a granel. Sin embargo, este método no es práctico y demasiado costoso.

- **Serología.**

Se realiza a través del ensayo de ELISA, a través del antisuero comercial de *Cmm*. Las limitaciones de este ensayo implican el tratamiento y preparación específica de la muestra, el requerimiento de personal especializado para su operación, el requerimiento de equipo instrumental poco accesible, así como la dificultad para su traslado al campo. [11]

- **Inmunoaislamiento.**

Es el resultado de la combinación de las técnicas de serología, y la utilización de medios semiselectivos. Mejora la selectividad y la sensibilidad de los ensayos, aunque con un grado mayor de complejidad.

- **Análisis FAME (Fatty Acid Methyl Ester) y placas biológicas.**

En esta técnica, se analiza la composición de ácidos grasos mediante acoplamiento con la cromatografía de gases. Es un método poco sensible,

laborioso y costoso. El mayor beneficio, es la reducción de tiempos de procesamiento de muestras.

- **Prueba de patogenicidad.**

En este tipo de pruebas se analizan visualmente plantas de tomate para determinar la presencia del patógeno. Entre sus desventajas principales, se encuentra que el tiempo de respuesta es de tres días a varias semanas.

- **Análisis de ADN y plásmidos.**

Posterior a un tratamiento al genoma de *Cmm*, se obtienen fragmentos de plásmidos patógenos que inducen la infección. La desventaja principal es su alto costo y limitada disponibilidad [12].

- **PCR**

Con la determinación de los plásmidos patogénicos de *Cmm* se diseñaron cebadores (primers), los cuales amplifican la secuencia nucleotídica patogénica a través de la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction PCR). Actualmente, es la técnica más utilizada para determinar la presencia de fitopatógenos en cultivos comerciales, pero no es una técnica fácilmente accesible [3], [13]–[15]

Debido a la gran cantidad de desventajas que presentan los métodos actuales para el diagnóstico de *Cmm*, es necesario desarrollar estrategias más sencillas, fáciles de operar, de bajo costo, y que puedan ser distribuidas en gran escala. Los nanobiosensores representan una estrategia atractiva para este propósito.

4.4.- Nanobiosensores en la Agricultura

Según *Ahammad et al*, 2019, un sensor, es un dispositivo que detecta una cantidad variable de un analito específico, y lo convierte en señales observables. Las características relevantes de un sensor son la sensibilidad, reproducibilidad, precisión de la información detectada, selectividad, y la estabilidad [16]. Cuando se detectan señales proporcionales a la concentración de un analito de naturaleza biológica, o se utilizan macromoléculas derivadas de seres vivos, a estos

instrumentos se les denomina como biosensores. En el campo biomédico, los biosensores se emplean en la detección y monitoreo de enfermedades, descubrimiento de fármacos, la detección de contaminantes, microorganismos causantes de enfermedades, y marcadores que son indicadores diversos procesos bioquímicos en los fluidos corporales (sangre, orina, saliva, sudor). En los sistemas agrícolas, los biosensores podrían desempeñar un rol fundamental para el control de patologías, auxiliando la toma de decisiones para el manejo adecuado de los sistemas de cultivo (Figura 3).

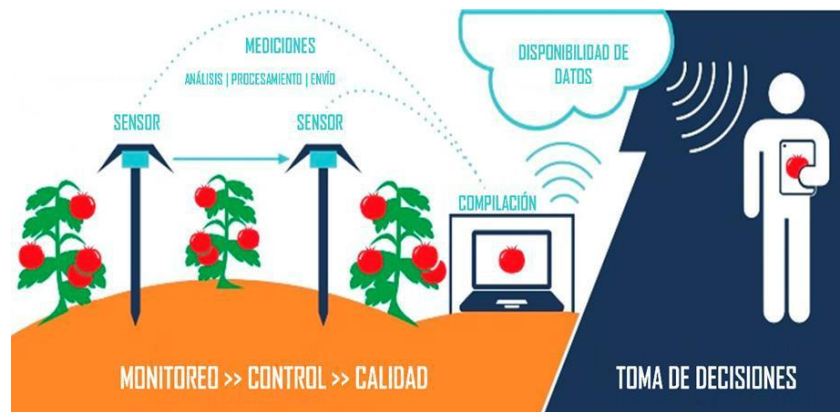


Figura 3. Aplicación de los nanosensores en la agricultura.

A continuación, en la figura 4 se presentan los principales componentes de un biosensor.

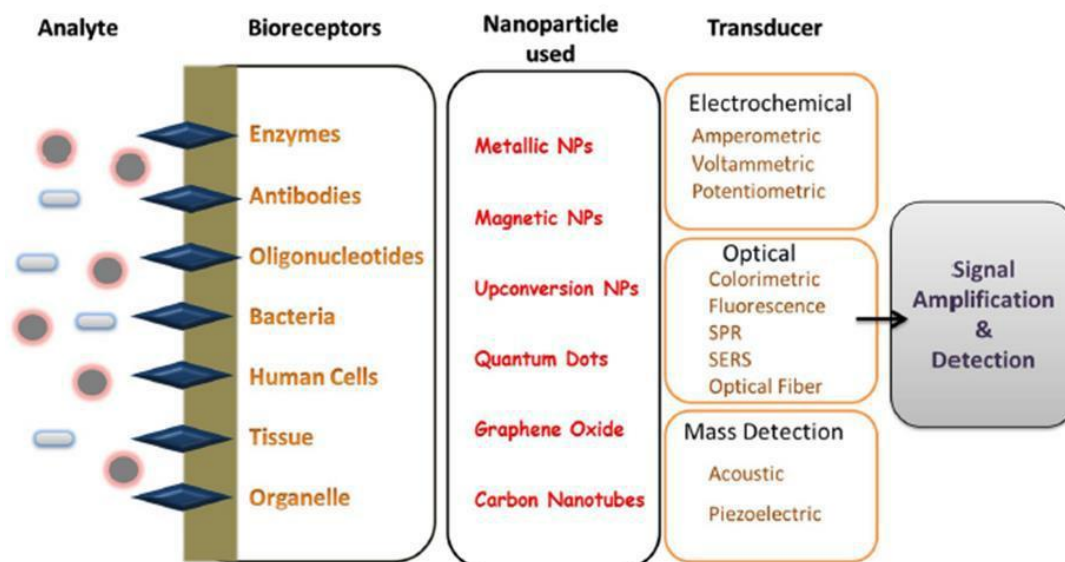


Figura 4. Principales componentes de un nano-biosensor: analito o muestra, biorreceptor, nanoestructuras potenciadoras de las señales, transductor, y amplificadores de señales (de izquierda a derecha).

A continuación, se describen brevemente los componentes un biosensor, reiterando que la optimización de cada uno de los elementos se refleja en el mayor rendimiento del biosensor [17].

- **Analito:** Sustancia que se desea detectar o cuantificar.
- **Biorreceptor:** Molécula que reconoce específicamente al analito, y emite una señal cuando se une a él (Bio-reconocimiento). Usualmente pueden utilizar nucleótidos, enzimas, anticuerpos, aptámeros, entre otros.
- **Nanomateriales:** Consisten en materiales en escala nanométrica (1-100 nm) con la capacidad de intensificar las señales derivadas de la interacción entre analito y biorreceptor.
- **Transductor:** Es un elemento que convierte una forma de energía a otra. Convierten el evento de reconocimiento biológico en una señal medible. La mayoría de los transductores producen señales ópticas o eléctricas que son proporcionales a la cantidad de interacciones analito-biorreceptor.

- **Amplificador de señales:** Procesa la señal transducida y la presenta. Consiste en un complejo circuito electrónico que realiza el acondicionamiento de la señal, como la amplificación y la conversión de señales de forma analógica a digital. Permite la fácil interpretación por el usuario. La señal de salida en la pantalla puede ser numérica, gráfica, tabular o una imagen, dependiendo de los requisitos del usuario final. En algunos casos específicos, principalmente en los biosensores ópticos, la señal puede ser interpretada “a simple vista” sin la necesidad de amplificadores de señales. Estos sistemas son deseables, pues evitan el requerimiento de instrumentos específicos, permitiendo la portabilidad de los métodos de análisis.

Después de su diseño y construcción, los elementos deseables que definen a los biosensores son los siguientes:

- **Selectividad:** Es la capacidad de un biorreceptor para detectar un analito específico en una muestra que contiene contaminantes o posibles interferentes. La selectividad depende de la elección del biorreceptor adecuado a lo que se busca.
- **Reproducibilidad:** Es la capacidad del biosensor para generar respuestas idénticas en una duplicación experimental. Se caracteriza por la precisión y exactitud del transductor la capacidad de fabricación de los biosensores. Proporcionan alta confiabilidad y robustez ante posibles inferencias.
- **Estabilidad:** Es el grado de susceptibilidad a las perturbaciones ambientales en el sistema de biodetección y sus alrededores. En consecuencia, afecta la precisión y exactitud del biosensor.
- **Sensibilidad:** Es la cantidad mínima de analito que puede ser detectada por un biosensor (concentraciones bajas como ng/mL o incluso fg/mL para confirmar la presencia de trazas de analitos en una muestra), la cual define su límite de detección (LOD).
- **Linealidad:** Muestra la precisión de la respuesta medida (para un conjunto de mediciones con diferentes concentraciones de analito), y se expresa mediante una ecuación definida por una línea recta, representada

matemáticamente como $y = mx + c$, donde x es la concentración del analito, y es la señal de salida, y m es la sensibilidad del biosensor (pendiente de la recta). La linealidad del biosensor puede estar asociada con la resolución (cambio de la concentración de un analito, la cual influye en la detección), y el rango de concentraciones de analito bajo prueba. Siempre es deseable una mayor resolución [17].

Con las nuevas necesidades agroalimentarias, Srivastava, et. al., 2018 argumenta que los biosensores actualmente se han perfeccionado y diversificado para su aplicación en la medición de diferentes parámetros de interés en la agricultura moderna, como el monitoreo físico de la temperatura, la humedad, la calidad del suelo, la fertilidad, la determinación del ambiente microbiológico del suelo, el indicador de la viabilidad y la vida útil de las semillas, los sensores de respuesta para el riego y la seguridad en la agronomía, la agricultura de precisión, la detección de residuos pesticidas, fertilizantes y toxinas, y monitoreo patológico de plantas [18].

4.5.- Nanosensores basados en efectos ópticos

Se han utilizado una gran variedad de métodos ópticos en biosensores, basados en diversos tipos de espectroscopía como fluorescencia, absorbancia UV-Vis, Raman, resonancia plasmónica superficial e interferometría [18]. A continuación, se describen las características ópticas que definen a las nanopartículas, de manera precisa aquellas desarrolladas en este trabajo.

4.6.- Partículas metálicas y nanoplasmonica

Actualmente se han sintetizado nanomateriales de una gran cantidad de elementos presentes en la tabla periódica, entre los que destacan los metales, óxidos de metales, y diversos materiales nanocarbonosos como los nanotubos, el grafeno, los fulerenos y los puntos cuánticos de carbono [19]. Varios autores concluyen que los sensores creados a partir de metales acuñables son capaces de ofrecer gran

sensibilidad y selectividad. Los metales más utilizados para la elaboración de nanoestructuras destinadas a la elaboración de nanosensores son los siguientes: rodio (Rh), rutenio (Ru), paladio (Pd), plata (Ag), osmio (Os), iridio (Ir), platino (Pt) y oro (Au), los cuales poseen gran resistencia a la corrosión y oxidación, incluso a temperaturas elevadas. Se han desarrollado diferentes dispositivos utilizando dichos metales para el monitoreo ambiental y la seguridad alimentaria, basados principalmente en efectos plasmónicos [20]–[22]. Los plasmones de resonancia, son oscilaciones colectivas de electrones (nubes electrónicas) que se desplazan de manera conjunta en las superficies de algunos metales, como se ilustra en la figura 5 [23].

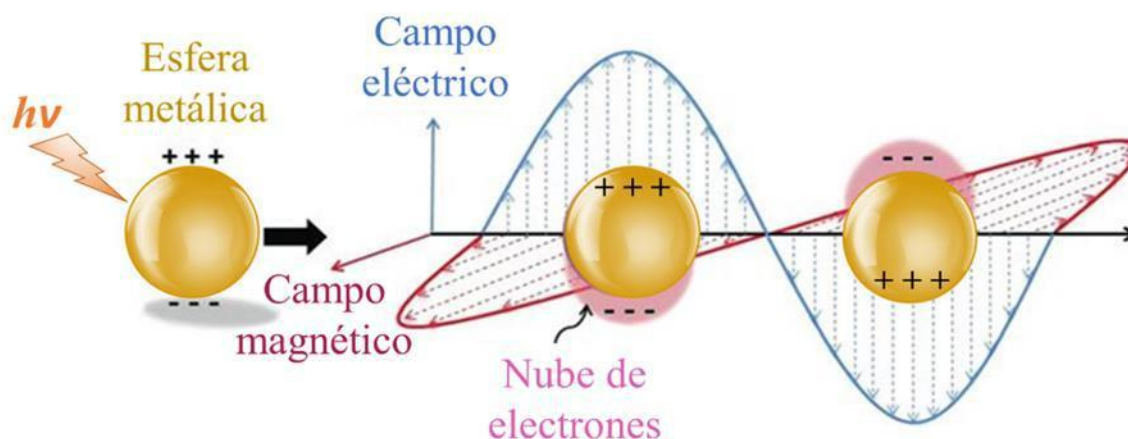


Figura 5. Representación esquemática de un plasmón de resonancia de superficie localizado.

Los **Plasmones de Superficie Localizadas (LSPRs)**, son ondas electromagnéticas confinadas en nanoestructuras metálicas de elementos como el oro, la plata, el cobre, entre otros. Los nanosensores basados en LSPRs se han diseñado para la detección de analitos químicos y biológicos. El desplazamiento de la banda plasmónica causado por la unión específica del analito con la superficie de la nanopartícula modificada con un ligando (se emplea como señal de detección

óptica). Este fenómeno es fácilmente observable a simple vista, y cuantificable mediante instrumentos de espectroscopía de absorbancia ultravioleta-visible. Mediante la utilización concentraciones pequeñas de nanopartículas se pueden desarrollar sistemas altamente sensibles, denominados nanosensores plasmónicos. Este tipo de nanosensores nos ofrece alta sensibilidad y fotoestabilidad, llegando a permitir su aplicación *in vivo* [23].

4.7.- Nanopartículas de Conversión Ascendentes (UPNPs)

Los nanocristales con emisiones por conversión ascendente son materiales que al ser excitados por radiación infrarroja, emiten luminiscencia en la región visible del espectro electromagnético. Estos materiales presentan diversas ventajas al compararlos con aquellos excitados con luz ultravioleta, principalmente su estabilidad química, y la calidad de sus emisiones. Estos materiales son aplicados para la elaboración de celdas solares, materiales láser, bioetiquetado, tecnologías de iluminación y visualización, así como en diversos nanosensores para la determinación de especies de relevancia para la salud, agrícola y medioambiental. El nanocristal NaYF_4 es uno de los materiales más eficientes, debido a su alta eficiencia de luminiscencia [24], [25].

4.8.- Bioreceptores como elementos de selectividad

Los biosensores primarios utilizan elementos de reconocimiento naturales que tradicionalmente se extraen de sistemas biológicos o ambientales, y que gracias al avance de la tecnología, ahora pueden ser fabricados de manera sintética [26]. En la tabla 3, y Figura 6, se muestra la clasificación de diferentes tipos de biomoléculas utilizadas como elementos de reconocimiento de biomoléculas, con sus ventajas y desventajas, así como una representación esquemática de su estructura simplificada [27]. El uso de diferentes biomoléculas en los biosensores depende de los analitos de interés, y por lo tanto, su mecanismo de reconocimiento puede fundamentarse en diferentes mecanismos [28].

Tabla 2. Elementos de reconocimiento de biomoléculas.

Biomoléculas	Ventajas	Desventajas
Anticuerpos	Gran especificidad derivada de una respuesta inmunogénica, y uso es independiente de otros sustratos.	Reconocen solamente antígenos específicos.
Nucleótidos	Se logra una respuesta con especificidad única, derivada del acoplamiento selectivo de bases nitrogenadas presentes en el ADN o ARN. Se utilizan secuencias únicas e irrepetibles en otros organismos de los diversos reinos de la biología.	Solo reconoce ADN y ARN, y no así otras posibles especies químicas.
Enzimas	Permiten la determinación de analitos en sistemas dinámicos, mediante la transformación de sustratos específicos asociados a la actividad enzimática.	Degradación de las enzimas por desnaturalización y requerimiento de cofactores.
Células Vivas	Los sistemas celulares íntegros proporcionan receptores, canales y enzimas específicos. Por lo tanto, garantizan una alta sensibilidad y selectividad, así como una respuesta que mimetiza a sistemas reales.	Corta vida útil, y en algunos casos tiempo de respuesta muy prolongado.
Aptámeros	Alta afinidad, selectividad, estabilidad, fiabilidad, y su	Se pueden presentar errores derivados de la

	producción es rápida, económica y pueden sintetizarse químicamente.	síntesis de la secuencia aptámerica.
--	---	--------------------------------------

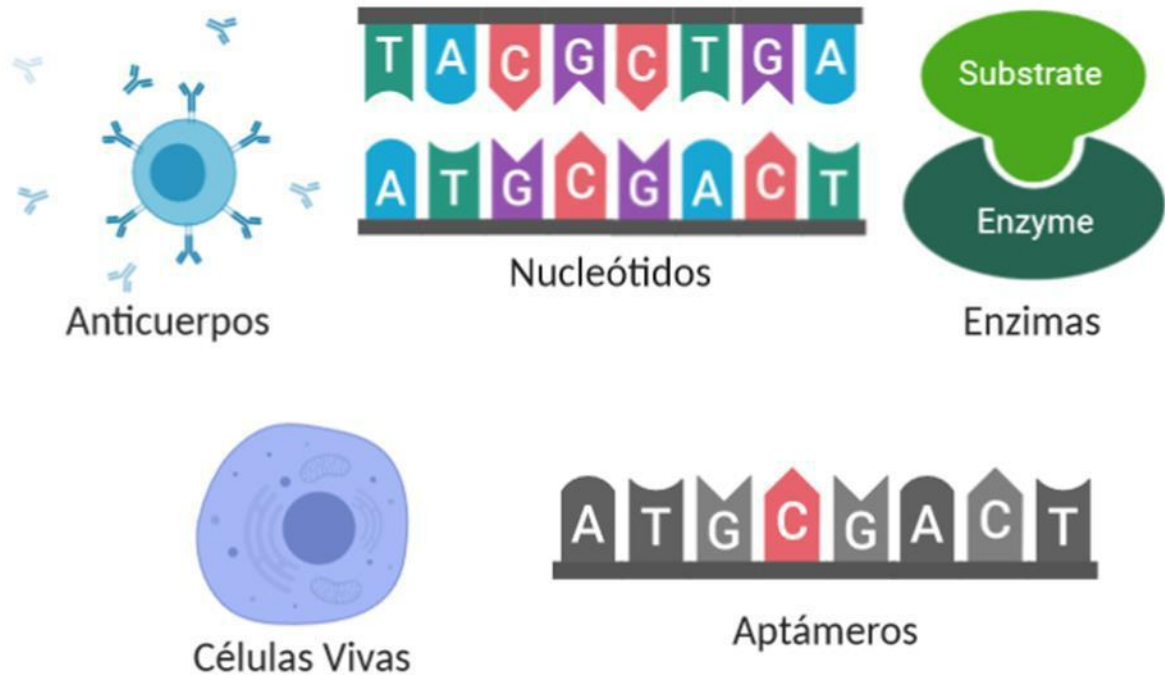


Figura 6. Elementos de reconocimiento de biomoléculas

4.9.- Biosensores basados en secuencias de nucleótidos (ADN y ARN)

La enorme cantidad de información genética aportada por la extensa secuenciación de los genomas ha planteado la necesidad de crear dispositivos analíticos simples, rápidos, baratos y de alto rendimiento para atender el diagnóstico molecular. La secuenciación del genoma ha permitido detectar, enfermedades hereditarias causadas por mutaciones, y patógenos a través de sus secuencias de ácidos nucleico específicas. De igual manera el análisis forense también se ha beneficiado de la tecnología de los biosensores basados en ADN y ARN. Dichos dispositivos analíticos, conocidos como biosensores, convierten una reacción o interacción

bioquímica en una señal analítica que puede amplificarse, procesarse y registrarse. Entre ellos, los biosensores de ADN (ver figura 7) consisten en una cadena de ADN inmovilizada para detectar la secuencia complementaria por hibridación de ADN-ADN. Esta tecnología se está desarrollando rápidamente con el objetivo de realizar pruebas rápidas, simples y económicas de diversas enfermedades genéticas e infecciosas, y para detectar daños e interacciones de diversas sustancias con el ADN.

El entorno de las sondas inmovilizadas en la superficie sólida, depende del modo de inmovilización. Dependiendo de la naturaleza del transductor físico, se pueden usar varios esquemas para unir la sonda de ADN a la superficie. Estos incluyen el uso de ADN tiolado para autoensamblar en transductores de oro (como las nanopartículas o la superficie de electrodos), a través de enlaces covalentes. También se utiliza el ADN biotinilado para la formación de complejos con superficies modificadas con avidina o estreptavidina. Además, se pueden realizar acoplamiento mediante enlaces covalentes derivados de reacciones químicas, por ejemplo, a través de la formación del enlace (carbodiimida formado al unir un grupo amina con un grupo carboxilo). En el presente trabajo se muestra además una estrategia innovadora de acoplamiento entre superficies de nanomateriales, y oligonucleótidos. Esto se describirá en las secciones de metodología y en la de resultados.

Además, para el desarrollo de nanosensores que utilizan oligonucleótidos como elemento de reconocimiento, se deben optimizar las condiciones para los eventos de hibridación interfacial (por ejemplo, fuerza iónica, temperatura, presencia de aceleradores). La deshibridación química y térmicamente inducida del dúplex resultante se usa a menudo para regenerar la interfaz [29], [30]. Los biosensores ópticos de ADN se basan comúnmente en una fibra óptica para transducir la señal de emisión de una etiqueta fluorescente, o en suspensiones de nanopartículas con respuesta óptica, como las desarrolladas en el presente trabajo.

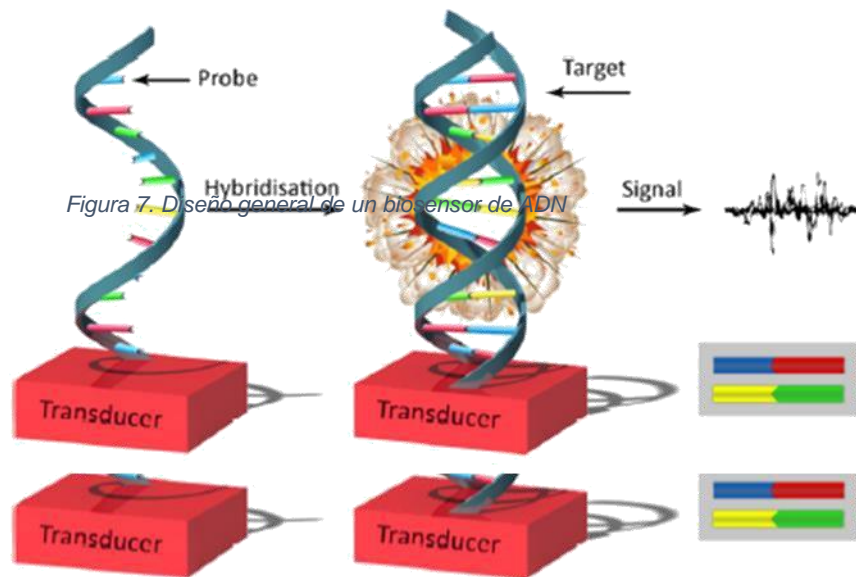


Figura 7. Diseño general de un biosensor de ADN [31].

4.10.- Trabajos previos para *Clavibacter michiganensis*

Hasta la fecha, se han utilizado compuestos multimembrana (tiras reactivas de flujo lateral) que contienen anticuerpos policlonales contra las bacterias y conjugados de nanopartículas de oro, los cuales se han aplicado para la detección de *Clavibacter michiganensis subsp sepedonicus*, la cual afecta el cultivo de la papa. Los resultados del análisis se han comparado con los obtenidos por el método de PCR, y utilizando los kits comerciales de inmunoensayo enzimático. La efectividad del inmunoensayo de flujo lateral se confirmó en un 96,2% de los casos, lo que respalda la alta correlación con otros enfoques analíticos [32]. En otro estudio relacionado con la detección de *Clavibacter michiganensis* a través de anticuerpos específicos, se concluyó que la morfología y el tamaño del nanomaterial influye en la sensibilidad del nanosensor [33]. Actualmente, en el mercado podemos encontrar tiras inmunológicas (Inmunostrips®), capaces de detectar a la bacteria con base en el fundamento teórico anterior. Se ha demostrado que el tiempo de reacción es directamente influido por la composición de la muestra y por la concentración de

bacteria [34]. Los límites de detección de esta técnica no son muy elevados debido a posibles interferencias derivadas de efectos de matriz que afectan el flujo de las células en las tiras de análisis.

Además de los biosensores fundamentados en el uso de anticuerpos, se han utilizado células vivas para detectar *Clavibacter m. subsp m.* a través de la técnica de espectroscopía Micro-Raman (láser de 532 nm λ), considerando su característica señal a manera de “huella digital” proporcionada por el espectro Raman. Esta técnica demostró gran velocidad, eficiencia y utilidad como método no destructivo para la detección preliminar de *Cmm*, permitiendo diferenciar *Cmm* de otras bacterias similares [35]. Sin embargo, la interpretación de los resultados obtenidos mediante esta técnica no es instantánea, y requiere de la implementación de diferentes parámetros analíticos y quimiométricos.

A pesar de dichos avances, es necesario continuar el progreso de los biosensores para la obtención de señales más precisas, de manera selectiva, rápida, y que pueda ser interpretada mediante tecnologías portátiles que puedan ser llevadas fácilmente al campo. Lo anterior implica el desarrollo de nuevos nanomateriales capaces de intensificar las respuestas analíticas de la bacteria, así como la detección de nuevas secciones específicas del genoma de *Cmm*, mismas que permitan la determinación de la bacteria disminuyendo al máximo los efectos de potenciales efectos interferentes. Se requiere que esas sondas sean específicas y capaces de diferenciar las señales entre subespecies del mismo grupo de bacterias. Por lo anterior, en el presente trabajo se aplicaron diversas estrategias bioinformáticas para la identificación y diseño de nuevas sondas de ADN.

4.11- Recursos bioinformáticos

La bioinformática surgió de la necesidad de analizar datos obtenidos a partir de la secuenciación del ADN. El nacimiento de esta disciplina fue influenciado fuertemente por la informática. La bioinformática tiene la finalidad de construir herramientas informáticas para facilitar el análisis de grandes volúmenes de datos

y contestar preguntas enfocadas al área de la biología. Actualmente, la bioinformática se ha consolidado como un campo interdisciplinario que involucra biología, informática, matemáticas y estadística con el objetivo de obtener conocimiento y desarrollo tecnológico en las ciencias de la vida.[35, 36].

Para lograr el objetivo de la bioinformática se requiere de recursos, éstos son las bases de datos: colección de volúmenes de información obtenida de experimentos científicos y análisis computacionales que se disponen al público de manera comprensiva y ordenada [38]. Por esa razón, en 1988, se fundó, el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) para desarrollar sistemas de información biológica. En la página web del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), podemos encontrar diversas bases de datos como Base de datos desde secuencias de ácidos nucleicos GenBank (R) hasta base de datos de dominio conservado de proteínas. Además, de las bases de datos, el NCBI cuentan con herramientas especiales para manipular y descargar las bases de datos. [39]. La base de datos que nos va a dar información para poder identificar las regiones únicas en el genoma de *C. michiganensis* será la de secuencias de nucleótidos de genomas secuenciados, que actualmente ha incorporado una gran cantidad de genomas de microorganismos representativos de los tres grandes reinos.

4.12.- Identificación de regiones únicas del genoma de *Clavibacter michiganensis*.

Las regiones genómicas únicas de una especie en particular se definen como aquella región menos similar en comparación con un conjunto de secuencias de genomas de diferentes especies de microorganismos.

En el área de Bioinformática del departamento de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en conjunto con investigadores de la división de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C., desarrollamos una tubería de comandos (herramienta bioinformática) para identificar regiones únicas de un genoma dado por medio de la

comparación sistemática de todas las subsecuencias de tamaño determinado de ese genoma con secuencias de genomas de otras especies diferentes.

El algoritmo que se implementó en la tubería de comandos utiliza el concepto astronómico del Agujero Negro; aquella estrella masiva que absorbe a cualquier objeto que haya pasado el horizonte de eventos, incluso hasta la luz es atrapada. En este algoritmo el agujero negro representa las secuencias de un genoma en particular de la base de datos; estas secuencias pueden ser cromosomas, andamios, secuencias contiguas, el cual se coloca en el punto central del espacio de búsqueda definido por el espacio requerido para albergar el agujero negro y las estrellas que lo rodean y que representan todos los fragmentos posibles generados a partir del genoma problema o genoma consulta. Después se calcula la distancia entre cada una de las estrellas y el agujero negro.

La distancia indica qué tan similar es un fragmento de secuencia de un genoma problema, representado por la estrella, y una subsecuencia del genoma en la base de datos representada por el agujero negro. Si la distancia es corta, ambas secuencias son muy similares; pero si la distancia es grande, ambas secuencias son menos similares.

El radio del horizonte de eventos se establece en una distancia de corte. Si la distancia entre una estrella y el agujero negro es más corta que la distancia de corte, la estrella se elimina del espacio de búsqueda porque es absorbida por el agujero negro. De manera inversa, si la distancia es mayor que la distancia de corte, la estrella permanece en el espacio de búsqueda. Este procedimiento se repite a lo largo de todos los agujeros negros. Este algoritmo se implementó en una tubería de comandos para encontrar las regiones genómicas únicas del genoma de *C. michiganensis* y se llama BESTur, y está disponible de manera gratuita en el repositorio de GitHub (www.github.com/exseivier/bestur).

En la implementación del algoritmo decidimos utilizar la herramienta Blastn para medir las distancias entre cada una de las estrellas con el agujero negro ya que Blastn es una herramienta veloz, eficiente en memoria y muy flexible que permite

encontrar tanto secuencias muy similares, así como no tan similares. Esta herramienta utiliza dos parámetros que nos hablan de la similitud entre las secuencias comparadas; éstas son el porcentaje de identidad (IDENT), el porcentaje de cobertura del segmento pareado con alto puntaje (QCOV) y el e-valué (EVAL). IDENT mide el porcentaje del número de bases bien apareadas, el parámetro QCOV mide el porcentaje del fragmento que alineó con un alto puntaje con alguna subsecuencia del genoma de la base de datos, y el EVAL es una medida de significancia estadística del hallazgo realizado por Blastn que a su vez está relacionado con el puntaje del alineamiento.

Estas medidas nos van a permitir configurar una distancia del radio del horizonte de eventos del agujero negro en el algoritmo. Además de esos parámetros, BESTur acepta los parámetros de puntaje como la recompensa por un nucleótido bien apareado (REC), la penalidad por un nucleótido mal apareado (PEN), y las penalizaciones por la existencia de un espacio (ESP) y por su extensión (EXT). BESTur utiliza otros parámetros para el proceso de fragmentado del genoma consulta o problema y éstos son el tamaño de la ventana (VENT) que es el tamaño en nucleótidos que tendrá el fragmento y el tamaño de salto (SALTO), que es el número de nucleótidos que va a saltar la ventana para tomar el siguiente fragmento del genoma.

También toma como argumento dos parámetros para el proceso de ensamble de los fragmentos: el mínimo número de fragmentos para ensamblar (MINFRAG) y el mínimo número de nucleótidos que separan a dos fragmentos (SEP) para tomarlos en cuenta en un fragmento ensamblado. Al final, las regiones únicas identificadas van a ser seleccionadas para diseñar las sondas de DNA específicas para *C. michiganensis*.

De manera sinérgica, el acoplamiento de sondas de ADN muy específicas, producto del análisis bioinformático, con nuevos nanomateriales ópticamente activos, representan una oportunidad única para el desarrollo de nuevos biosensores capaces de diagnosticar diversas enfermedades por la identificación específica de

los agentes causales de relevancia agrícola, mismos que ayudarían a tomar las decisiones correctas en el campo, y con ello a garantizar la soberanía alimentaria.

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Síntesis de nanomateriales

5.1.1.- Síntesis de nanopartículas de oro (AuNSs) mediante método de Turkevich.

Se utilizó el método de Turkevich modificado para sintetizar nanopartículas de oro, el cual consiste en las siguientes etapas principales ilustradas en la Figura 8. Primeramente, se calentaron 150 mL de una disolución recién preparada de citrato de sodio 2,2 mM que contenía 0,1 mL de ácido tánico 2,5 mM y 1 mL de carbonato de potasio 150 mM, con agitación magnética vigorosa. Cuando la temperatura alcanzó 70 °C, se inyectó 1 mL de HAuCl₄ 25 mM hasta que la solución se volvió roja (alrededor de 2 min). La solución se mantuvo a 70 °C durante 5 minutos más para asegurar una reacción completa [41].

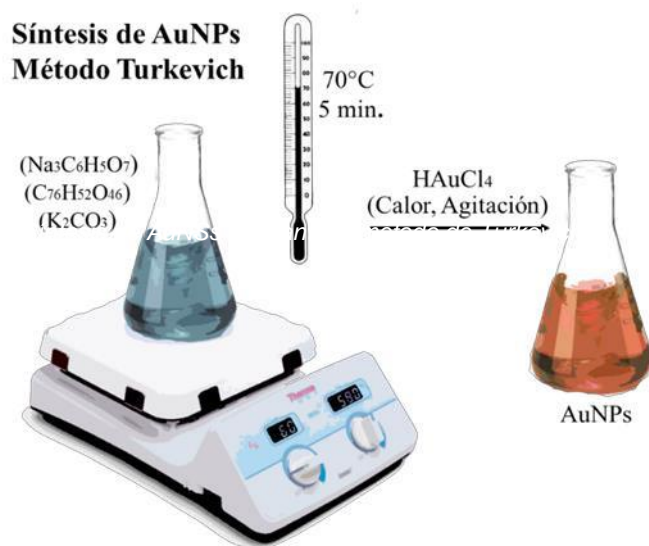


Figura 8. Síntesis de AuNSs mediante el método de Turkevich modificado.

5.1.2.-Síntesis de nanopartículas de oro en forma de estrella (AuNSt).

Las AuNSt se sintetizaron utilizando nano esferas de oro (AuNSt) como precursores (Método de Turkevich). Para ello, se añadieron 200 μL de AuNSp sintetizadas previamente a 10 mL de disolución de HAuCl_4 0,5 mM junto con 100 μL de HCl 1 M con agitación moderada a temperatura ambiente. Luego, se aumentó la velocidad de agitación a 700 rpm, a lo que siguió la rápida adición de 40 μL de solución de nitrato de plata 0,025 M y 126 μL de ácido ascórbico 0,1 M simultáneamente. Se cree que el nitrato de plata ayuda al crecimiento anisotrópico de nano antenas de Au en ciertas facetas cristalográficas. Se observó una coloración azul, lo que verifica la síntesis de AuNSt. Luego, las nanopartículas se lavaron tres veces con agua destilada, y recuperadas mediante centrifugación durante 5 min con una velocidad de no superior a 4000 rpm para evitar cualquier aglomeración [42].

5.1.3.-Síntesis de nanopartículas con luminiscencia por conversión ascendente (UCNPs).

Se agitaron vigorosamente 0,4508 g de Y_2O_3 , 0,1773 g de Yb_2O_3 y 0,0199 g de Er_2O_3 con 40 mL de HCl hasta que la solución se volvió transparente y luego la solución se evaporó a sequedad. Se añadió un volumen mínimo de agua desionizada al vaso de precipitados para disolver los cristales de cloruro formados, y luego la disolución se mezcló magnéticamente con 30 mL de ácido oleico y 75 mL de 1-octadeceno durante 20 min. Luego, la mezcla se calentó a 150 °C con flujo de N_2 durante 30 min para formar una solución de color amarillo claro. Una vez que la solución se enfrió a temperatura ambiente, se añadió al matraz otra mezcla de 0,7522 g de NH_4F y 0,5116 g de NaOH disueltos en 50 mL de metanol. Después de agitar durante 30 min, la disolución se calentó a 110°C, y se mantuvo a esta temperatura durante 30 min más para evaporar completamente el metanol. La disolución se calentó finalmente a 280 ° C durante 45 min bajo la protección con flujo de N_2 . Una vez que la solución alcanzó la temperatura ambiente, los

nanocristales de $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ se precipitaron de la solución con acetona, y se lavaron tres veces con etanol/agua (1: 1 v/v) [41].

5.1.4.-Síntesis de UCNPs-ZrO₂

Para la incorporación de la coraza de ZrO_2 , primeramente, se llevó a cabo la eliminación del ligando oleato de la superficie mediante la dispersión de 100 mg de UCNPs obtenidas en la etapa anterior, en 10 mL de agua. Se agitó magnéticamente durante 2 h manteniendo el pH en 4.0 mediante la adición de HCl 0,1 M. A continuación, se eliminó el ácido oleico de la suspensión acuosa mediante extracción con éter dietílico, repitiendo este proceso durante tres veces. La fracción dispersable en agua se recuperó por centrifugación, y luego se lavó tres veces con etanol absoluto. Las UCNPs-ZrO₂ con estructura núcleo-coraza fueron preparadas acorde a la publicación de Ramírez García G. *et al* (2019) [43]. Las corazas de óxido de zirconio se prepararon controlando la hidrólisis y condensación de n-butóxido de zirconio ($\text{Zr}(\text{OBU})_4$). En una reacción típica, 100 mg de UCNPs sin ligando se dispersaron homogéneamente por ultrasonido en una mezcla de 20 mL de etanol absoluto, 120 μL de agua y 100 μL de NH_4OH , y se mantuvieron bajo agitación vigorosa usando una barra magnética (Mezcla A). Se disolvió un volumen apropiado de $\text{Zr}(\text{OBU})_4$ en 20 mL de etanol absoluto (Mezcla B). Después, la Mezcla B se añadió gota a gota a la Mezcla A en un lapso de 2 horas (5 mL cada 30 min). A continuación, las dispersiones se calentaron a 40°C, y se mantuvieron a dicha temperatura durante 3 horas más con agitación. Los productos se aislaron por centrifugación, y se lavaron tres veces con etanol absoluto. Se eliminó el exceso de disolvente, y luego se secaron las nanopartículas resultantes a temperatura ambiente. Finalmente, la muestra se recoció a 500 °C durante 3 horas usando una rampa de aumento de temperatura de 20 °C por minuto.

5.2.- Caracterización fisicoquímica de los nanomateriales

5.2.1.- Espectroscopía UV-Vis

Para obtener los espectros de absorción se utilizó un espectrofotómetro Varían Cary 50 UV-Vis de Agilent, utilizando celdas de cuarzo. Para la preparación de la muestra, las NPs coloidales en agua desionizada fueron sometidas a sonicación durante cinco minutos en un ultrasonicador M1800 de BRANSON. Los espectros UV-Vis se registraron en el intervalo de 400 a 800 nm.

5.2.2.- Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Los espectros FT-IR se registraron en un espectrómetro Nicolet iS5 FT-IR de Thermo Scientific con accesorio de muestreo de reflectancia total atenuada universal (ATR). Como elemento de reflexión interna (ERI) se utilizó cristal de Germanio. No fue necesario realizar una preparación previa de la muestra.

5.2.3.- Microscopía electrónica de transmisión y barrido (STEM)

La morfología y tamaño de los nanomateriales fue analizada mediante Microscopía Electrónica de Transmisión de Barrido (STEM), depositando una gota de las suspensiones de cada muestra sobre rejillas de cobre, y observadas mediante un instrumento de alta resolución SU8230 de la marca Hitachi.

5.2.4.- Espectroscopía de fluorescencia

Los espectros de emisión se obtuvieron un diodo láser continuo con longitud de onda de emisión centrada en 975 nm (Roithner Laser MDL 111-975-2W). La luminiscencia fue analizada mediante un espectrógrafo Spectra Acton Pro 3500i acoplado a un tubo fotomultiplicador R955 de Hamamatsu. El sistema fue controlado mediante el software Spectra Sense.

La excitación de las nanopartículas en las plantas se llevó a cabo sobre una planta de tomate obtenida en un invernadero, utilizando un láser portátil Roithner Laser con una potencia de emisión de 300 mW y una longitud de onda de 980 nm.

5.3.- Identificación de las regiones únicas del genoma de *Clavibacter michiganensis*.

Para identificar las regiones únicas del genoma de *C. michiganensis* a partir de muestras de semilla, es necesario definir el genoma problema o consulta, que en este caso es el genoma de *C. michiganensis subsp. michiganensis* (strain UF1), y la base de datos de genomas de diferentes especies que comparten un nicho común en el medio ambiente, que para este caso en particular sería la semilla. Para definir el microbioma de la semilla, nos basamos en los siguientes reportes de secuenciación de metagenomas realizados en semillas de tomate [Bergna et al., 2018; Al-Askar et al., 2014]. De esta forma definimos una base de datos de 73 genomas de especies representativas de bacterias y hongos que vamos a utilizar para hacer las comparaciones sistemáticas con la herramienta BESTur.

Realizamos un análisis sistemático de identificación de regiones únicas en donde variamos los parámetros IDENT= [10, 30, 50, 60, 65, 70%] y QCOV= [20, 40%], y mantuvimos los demás parámetros por defecto: EVAL=10, REC=1, PEN=1, ESP=0, EXT=2, MINFRAG=2, SEP=50, VENT=500 y SALTO=250. El genoma consulta o problema fue el de *C. michiganensis* (strain) y la base de datos que utilizamos fue la que definimos anteriormente.

5.3.1.- Diseño de la sonda y síntesis de sondas

Se utilizó las regiones únicas identificadas con BESTur para diseñar sondas de ADN dirigidas hacia esas regiones. Para lograr ese objetivo primero mapeamos los fragmentos obtenidos y calificamos su calidad con el siguiente procedimiento de puntaje. Todos los fragmentos ensamblados que quedaron completos en regiones

rodeados por elementos genómicos funcionales conocidos y similares a otras especies, y que haya fragmentos ensamblados de confirmación tanto en diversos análisis, entonces esos fragmentos recibieron una mejor puntuación que aquellos fragmentos que no tenían esas características. Todos los fragmentos fueron ordenados por su calificación de la más alta a la más baja y el primer cuartil superior fue seleccionado para ser utilizados como molde para el diseño de las sondas. El diseño de las secuencias fue guiado por el programa Primer_3_core (GitHub) tomando en cuenta las siguientes consideraciones.

1. Tamaños entre 18 a 24 nucleótidos.
2. Oligonucleótidos con un porcentaje de GC entre 50 y 60%.
3. Evitar aquellas secuencias ricas en regiones repetidas o de baja complejidad.
4. Evitar aquellas secuencias que formen hetero- o homodímeros.
5. Evitar aquellas secuencias que formen estructuras secundarias estables.
[40].

Primer_3_core regresa las secuencias que cumplieron con los requisitos establecidos y además les da puntuación. Entre más cercana a cero esté la puntuación es más óptimo el diseño de la sonda. Por lo que todas las sondas diseñadas fueron ordenadas de la puntuación más alta a la más baja y nos quedamos con la primera sonda a la cabeza. La síntesis de la sonda seleccionada fue realizada por T4 Oligos; ADN SINTÉTICO SAPI de SA (empresa mexicana).

VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1.- Síntesis y caracterización de las nanopartículas desarrolladas en este trabajo

La síntesis de nanoesferas de oro se llevó a cabo conforme al método de Turkevich modificado como se describe en la metodología. Se observó la formación de nanopartículas de color rojo intenso (Figura 9-a). Este color es característico de nanopartículas de oro con tamaño inferior a 10 nm, y es debido a la banda de absorción característica del plasmón de resonancia superficial, que usualmente aparece entre 510 y 530 nm (Figura 10). El ácido tánico y el citrato de sodio adicionados durante la síntesis permiten controlar el tamaño de las nanopartículas. El tamaño decrece hasta cierto límite como consecuencia de su concentración. El ácido tánico y el citrato de sodio funcionan como ligantes que permiten limitar el crecimiento de la partícula, y al mismo tiempo como estabilizadores químicos de su superficie. La presencia de dichas moléculas permite además la estabilización de las AuNSs y AuNSt en las suspensiones acuosas mediante la repulsión electrostática generada por sus grupos funcionales (-COOH). Por su parte, el carbonato de potasio juega un papel importante en la regulación del pH de la reacción. Para el éxito de la reacción, las concentraciones de citrato de sodio y ácido tánico deben ser controladas de manera adecuada para obtener nanopartículas del tamaño deseado. Las nanoesferas fueron usadas como precursores de las nanoestrellas, las cuales, se tornaron de color azul (Figura 9-b), presentando dos bandas de absorción en 500 y 580 nm (Figura 10), las cuales se deben a la absorción de la luz presentada por las diferentes dimensiones y partes de las nanoestrellas, es decir, los núcleos y los picos. Estos colores rojo y azul son característicos de las nanopartículas de oro con morfologías de esfera y estrella, respectivamente, y nos permiten verificar de manera sencilla el éxito de la reacción.

La presencia de estas coloraciones permitió además verificar la estabilidad de las nanopartículas en la suspensión, pues no se observaron aglomerados aún después de 6 meses después de haber realizado la síntesis.

Conforme a lo esperado, las UCNPs y las UCNPs-ZrO₂ no presentaron alguna banda de absorción característica.

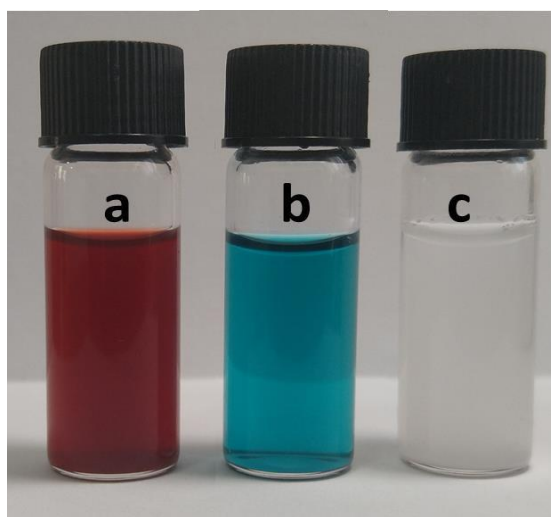


Figura 9. Fotografía de las suspensiones de a) AuNSp, b) AuNST, c) UCNPs-ZrO₂.

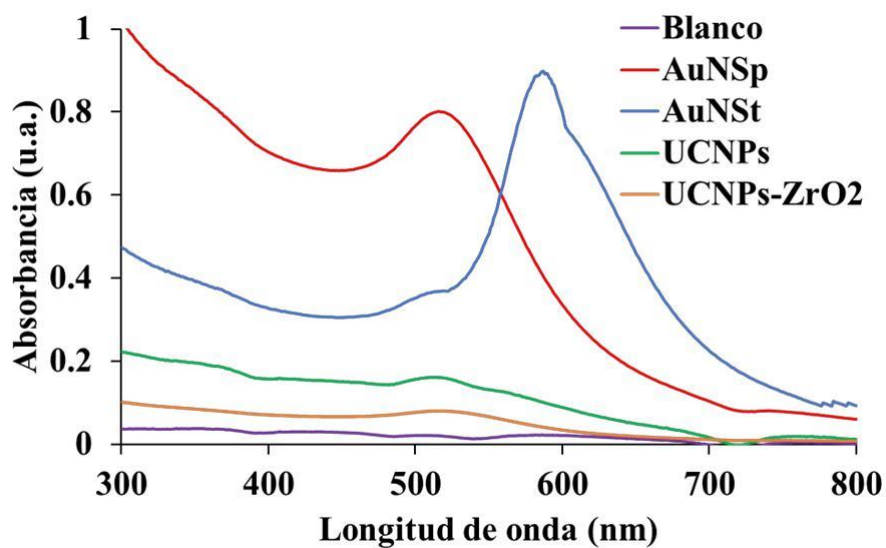


Figura 10. Espectros de absorción UV-Vis de las nanopartículas sintetizadas.

Con el objetivo de caracterizar el tamaño y morfología de las nanopartículas, se realizó la microscopía electrónica de tipo STEM (microscopía electrónica de transmisión y barrido), y se obtuvieron las imágenes mostradas en las Figuras 11 y 12.

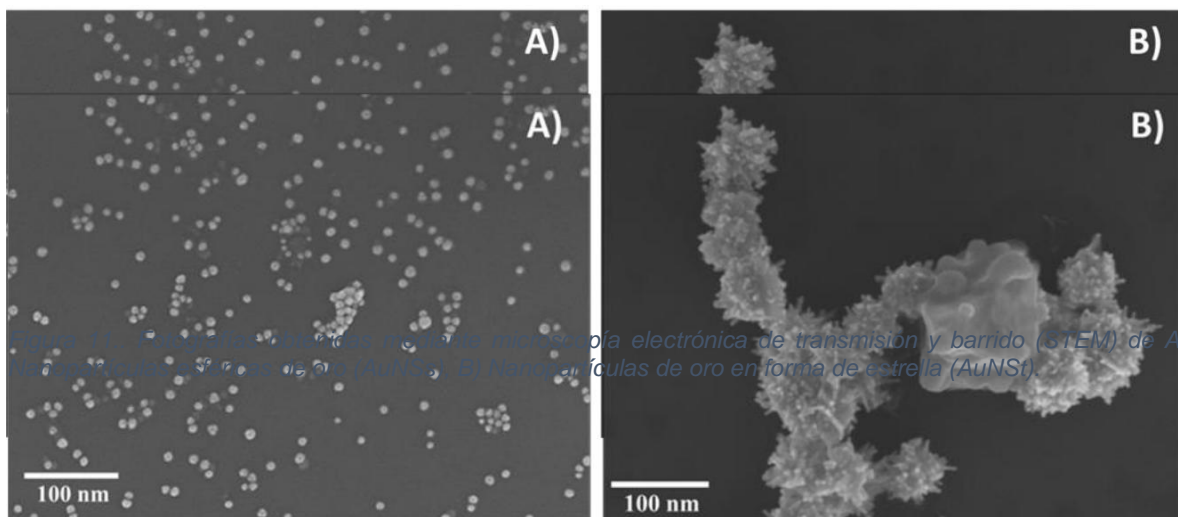


Figura 11. Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido (STEM) de A) Nanopartículas esféricas de oro (AuNSs), B) Nanopartículas de oro en forma de estrella (AuNSt).

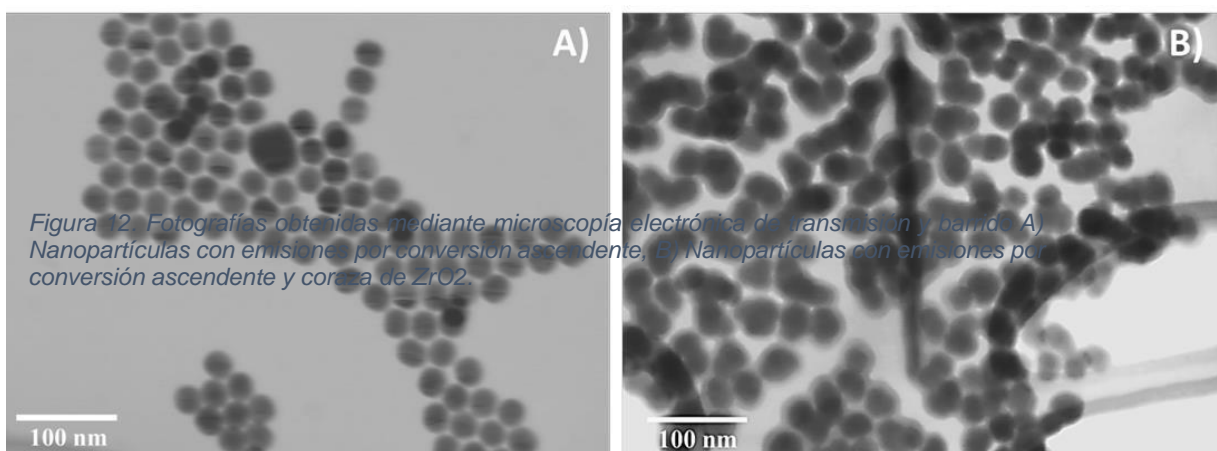


Figura 12. Fotografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido A) Nanopartículas con emisiones por conversión ascendente, B) Nanopartículas con emisiones por conversión ascendente y coraza de ZrO_2 .

En la Figura 11-A, se observan las AuNSs con un tamaño de 8 nm, con morfología esférica, y con una distribución de tamaño muy homogénea. Mediante esta técnica se verificó la formación de estructuras metálicas esféricas en la nanoescala. Por su parte, en la Figura 11-B se observan las AuNSt obtenidas utilizando a las AuNSs como precursores. Se observó un aumento considerable del tamaño, alcanzando dimensiones de entre 60 y 80 nm considerando la distancia entre las puntas de los picos presentes en puntos opuestos de cada nanoestrella. Dichos picos fueron bien definidos, y podrían permitir la interacción con mayor intensidad con la radiación electromagnética respecto a las nanoesferas. Además, se observaron nanoestructuras independientes, demostrando la ausencia de aglomeraciones, conforme a lo verificado por las fotografías de las suspensiones (Figura 9). Mediante la microscopía electrónica se observó además una correlación adecuada entre el tamaño de las nanopartículas de oro en su forma esférica y de estrella, y las longitudes de onda de absorción mostradas en la Figura 10, y conforme a lo estipulado por la bibliografía.

Por su parte, las nanopartículas con emisión por conversión ascendente (UCNPs) también presentaron materiales en forma esférica, con tamaño homogéneo centrado en 20 nm (Figura 12-A). Este tamaño corresponde a lo estimado conforme al método de síntesis utilizado. Dichas nanopartículas tampoco presentaron aglomeración, y además mostraron un alto grado de ordenamiento al ser depositadas sobre las rejillas utilizadas para su observación mediante microscopía electrónica STEM. En el caso de las UCNPs-ZrO₂ (Figura 12-B), se verificó la obtención de estructuras núcleo-coraza, con núcleos luminiscentes rodeados de manera continua por corazas individuales de ZrO₂ con 8 nm de espesor. Además, se mantuvo la ausencia de aglomeración. Se obtuvieron tamaños promedio de las estructuras núcleo-coraza de 36 nm. Esta coraza fue implementada con el objetivo de poder anclar de manera específica a las sondas de ADN diseñadas, mediante la interacción entre el zirconio y el grupo fosfato presente en el esqueleto de los oligonucleótidos. Posteriormente, ya sintetizados los nanomateriales se modificó la superficie para adaptar la sonda de ADN específica de *Cmm*, previamente diseñada y sintetizada. Para verificar la modificación de la superficie de las nanopartículas,

se utilizó la técnica de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) (ver Figura 13).

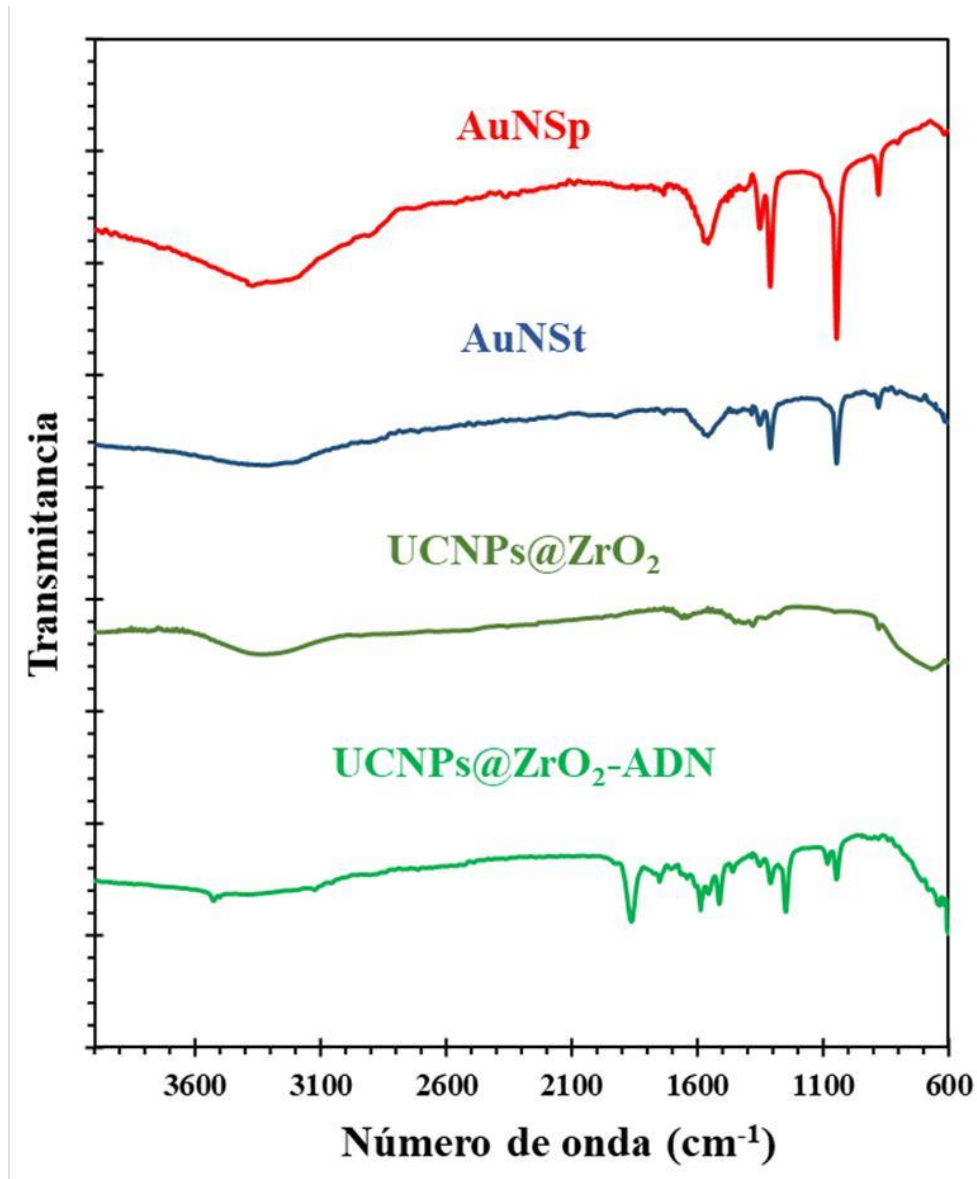


Figura 13. Espectros de FTIR de las nanopartículas sintetizadas.

En esta figura son comparados con los espectros de las diferentes nanoestructuras presentadas en este trabajo. Se muestran los tres tipos de nanopartículas (AuNSs, AuNSt, y UCNPs-ZrO₂). Los espectros FTIR de estas últimas son mostrados antes y después de ser modificadas con la sonda de ADN. En el caso de las nanoesferas y las nanoestrellas de oro, se observaron seis bandas diferentes: una banda

centrada alrededor de 3315 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de estiramiento del -OH , una banda a 1558 cm^{-1} que es asignada a las vibraciones de estiramiento del enlace C=O , una 1349 cm^{-1} corresponde a la flexión C-H , a 1309 cm^{-1} y 1045 cm^{-1} atribuibles a las vibraciones del enlace C-O , y una más en 879 cm^{-1} , asignada a la flexión del enlace C-H . Dichas vibraciones corresponden a la molécula de citrato que es usada como ligante y como agente reductor durante la síntesis de los dos tipos de nanopartículas de oro, indicando que las nanopartículas esféricas y en forma de estrella se encuentran funcionalizadas con esta molécula. Debido a los alcances de este trabajo, las nanoestructuras de oro no fueron modificadas con la sonda de ADN, pero se dejaron disponibles para ser modificadas al conseguir una sonda modificada con un grupo tiol, el cual es anclado de manera sencilla a las superficies de nanopartículas de oro, conforme a lo reportado en la literatura. [44]

Con el objetivo de proponer una nueva estrategia de modificación de nanopartículas con sondas de ADN, en este trabajo se decidió evaluar la modificación de las UCNPs-ZrO₂ desarrolladas mediante espectroscopía FTIR. En los espectros de las UCNPs-ZrO₂ conjugadas con la sonda de ADN (Figura 13) se observan diferentes bandas en la región de $1800\text{ a }1500\text{ cm}^{-1}$, las cuales corresponden a las bases nitrogenadas. Los picos correspondientes a los grupos carbonilo (C=O) de los diferentes nucleótidos son encontrados en el rango de $1700\text{ a }1675\text{ cm}^{-1}$. Las bandas en la región de $1500\text{ ~ }1250\text{ cm}^{-1}$ son causadas por las vibraciones de la ribosa, el azúcar estructural. Las bandas a $1495\text{ ~ }1476\text{ cm}^{-1}$ caracterizan las vibraciones de los ciclos imidazol de las moléculas de adenina y guanina. La banda de estiramiento anti-simétrica del grupo fosfato es observada a 1240 cm^{-1} , siendo una señal característica del ADN, pues este grupo se encuentra, en conjunto con la ribosa, como soporte primario de su estructura. Gracias a esas señales, es posible garantizar la modificación de la superficie de las nanopartículas con la sonda específica de ADN, lo que representa la estructura de un material que podría optimizarse para funcionar como nanosensor, en este caso para la detección de *Clavibacter michiganensis m.*

Las nanopartículas con emisiones por conversión ascendente (UCNPs) (Figura 14) son materiales generalmente dopados con lantánidos que convierten la luz infrarroja usada para su excitación en emisiones en las regiones ultravioleta, visible, o infrarrojo de longitudes de onda más cortas (por ejemplo, de 975 nm a 520 nm) mediante un proceso de absorción de múltiples fotones. Esos materiales presentan diversas ventajas para el desarrollo de nanosensores, la detección de biomarcadores, el escaneo óptico y algunas otras aplicaciones respecto a los fluoróforos convencionales mencionados anteriormente. Además de la eliminación de la autofluorescencia (y con ello el mejoramiento de la relación señal/ruido) y la resistencia a la foto-degradación, las UCNPs presentan emisiones intensas y modulables, baja toxicidad, prolongados tiempos de vida media de emisión, así como eliminación de los efectos causados por la luz de alta energía necesaria para la excitación [31].

NIR 980 nm \rightarrow UCNP \rightarrow UV-Vis-NIR

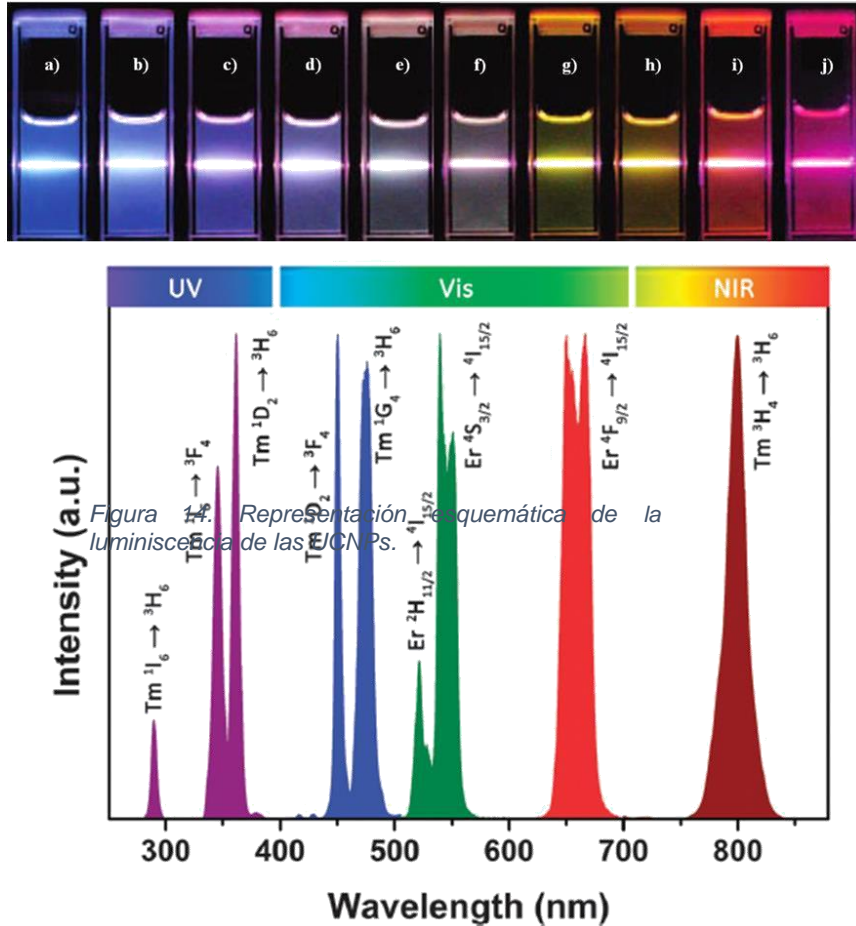


Figura 14. Representación esquemática de la luminiscencia de las UCNPs.

Figura 14. Representación esquemática de la luminiscencia de las UCNPs.

Con los resultados anteriores, se demostró la modificación de las UCNPs con coraza de óxido de zirconio mediante la implementación de la sonda de ADN en su superficie. A continuación, en la Figura 15 se presenta el esquema resumido del desarrollo del biosensor.

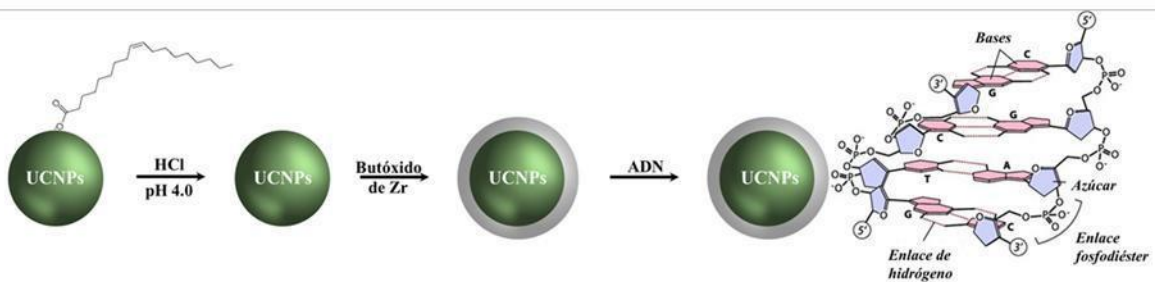


Figura 15. Esquema general de la síntesis de las UCNP_s-ZrO₂ funcionalizadas con sondas de ADN.

Posterior a la síntesis de los nanoconjugados UCNP_s-ZrO₂-ADN, se observó la emisión, después de ser excitadas con luz de 975 nm, como se muestra en la Figura 16-a. La emisión fue tan intensa que pudo ser observada a simple vista, sin la necesidad de alguna lente especial o condiciones de obscuridad. Esto es importante considerando su aplicación en el desarrollo de nanosensores. Mientras más intensa sea la emisión de las UCNP_s, los límites de detección de los analitos serán menores, logrando la detección de concentraciones más pequeñas.

De manera cuantitativa, en la Figura 16-c se observa el espectro de emisión de dichos nanoconjugados UCNP_s-ZrO₂-ADN, presentando bandas de emisión intensas centradas en la región del verde (520 y 545 nm), y bandas de emisión más débiles en la región del rojo (659 nm).

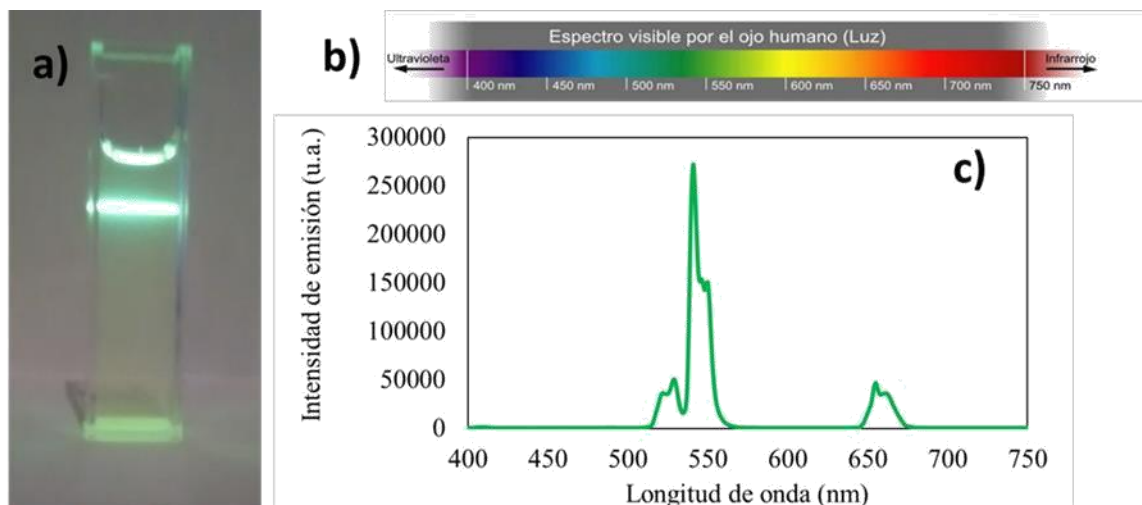


Figura 16. a) Espectro de emisión de las UCNPs-ZrO₂ sintetizadas, b) espectro electromagnético visible, y c) espectro de emisión de las UCNPs-ZrO₂ después de ser excitadas con luz de 975 nm.

Con el fin de demostrar la adhesión de UCNPs-ZrO₂-ADN en tejido vegetal, y la capacidad de ser detectadas en las diferentes partes de la planta, se realizaron adiciones por aspersión con atomizador en plantas de tomate, y se excitaron las hojas in vivo, en condiciones normales de iluminación (Figura 17). A pesar de la presencia de luz natural, fue posible observar la señal luminiscente de las UCNPs-ZrO₂-ADN sobre las hojas. Lo anterior representa una prueba de concepto suficiente para indicar que la señal luminiscente podría ser modulada en función de la concentración de la bacteria *Cmm*, y sus resultados interpretados en campo mediante la simple excitación con un láser portátil con emisiones en el infrarrojo (975 nm).

Finalmente, se realizó la aspersión de suspensiones acuosas de nanopartículas 3 (mg/mL) sobre la superficie de raíces, hojas, tallos y frutos de la planta de tomate, y la excitación con el láser infrarrojo descrito en el párrafo anterior (Figura 18). En todos los casos, las señales luminiscentes de las UCNPs-ZrO₂-ADN fueron visibles sin esfuerzo ni instrumentos especiales, observando las emisiones verdes características de los nanoconjugados.

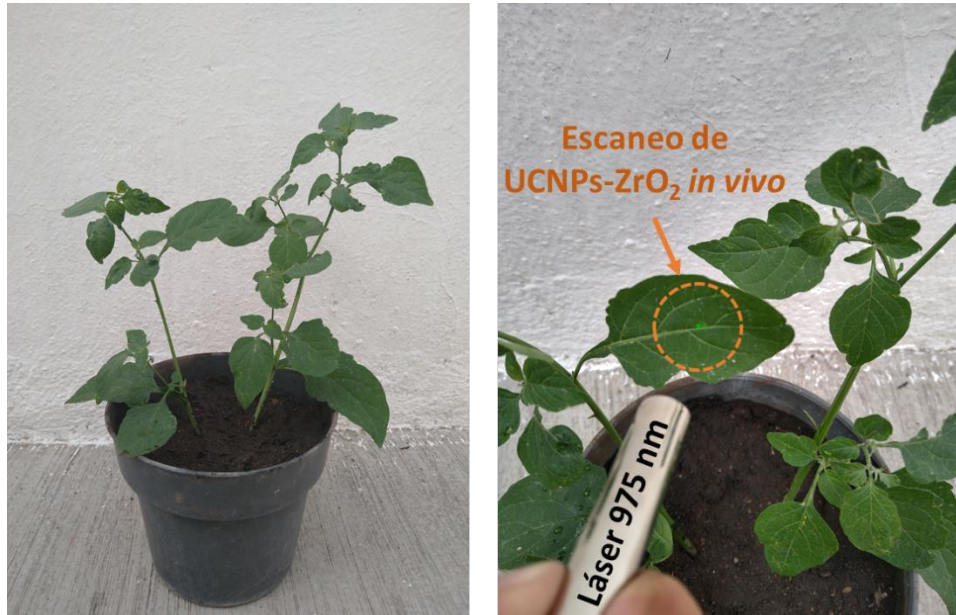


Figura 17. Planta de jitomates para prueba de concepto de escaneo de nanopartículas luminiscentes.

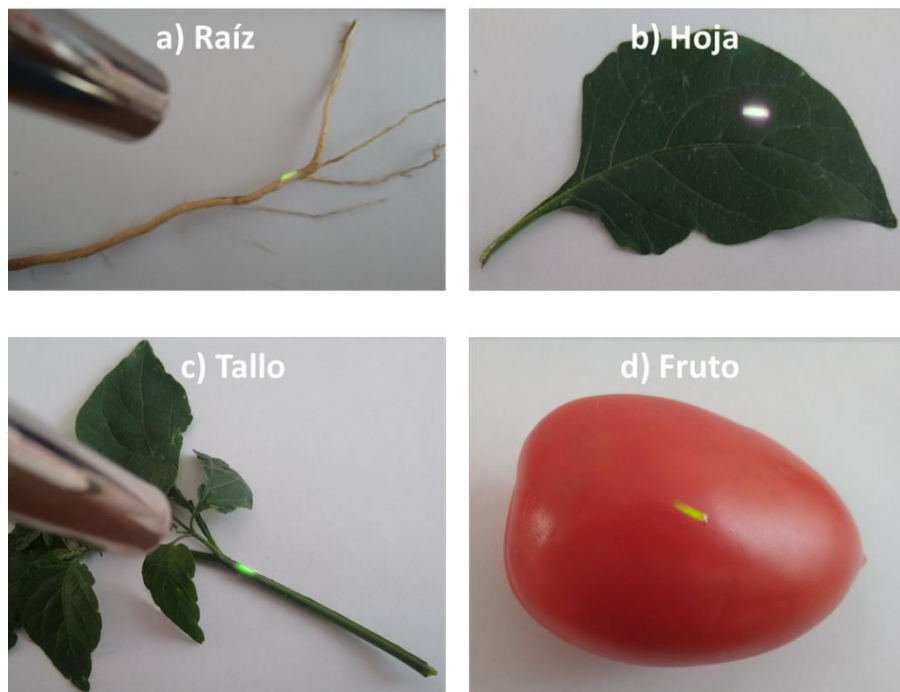


Figura 18. Escaneo de las UCNPs-ZrO₂-ADN en las diferentes partes de la planta de jitomate.

6.2.- Identificación de las regiones únicas del genoma de *Clavibacter michiganensis*.

Posteriormente del análisis bioinformático, se obtuvieron diversos resultados respecto al número de fragmentos que no fueron absorbidos por el agujero negro, así como el número de fragmentos ensamblados y sus tamaños, según los parámetros establecidos con anterioridad. Si el porcentaje de identidad (IDENT) y el porcentaje del segmento pareado con alto puntaje de la secuencia consulta (QCOV) incrementa la búsqueda con Blast se vuelve muy estricta y por lo tanto el radio del horizonte de eventos disminuye y menos fragmentos son absorbidos. Por el contrario, si los valores de esos parámetros disminuyen, la búsqueda con Blast se vuelven menos estrictas y el radio del horizonte de eventos incrementa absorbiendo más fragmentos. Con BESTur analizamos 73 genomas diferentes y en la Figura 19 se muestran el porcentaje del número de fragmentos que no fueron absorbidos respecto al total de fragmentos obtenidos del genoma del patógeno, después del análisis de comparaciones sistemáticas con los 73 genomas con los diferentes parámetros evaluados de porcentaje de identidad (IDENT: 10, 30, 50, 60, 65, 70), y porcentaje del segmento pareado de alto puntaje de la secuencia consulta (QCOV: 20% barras negras, y 40% barras grises), observamos que conforme se vuelve más estricta la búsqueda con Blast más fragmentos sobreviven la atracción del agujero negro y son mantenidos.

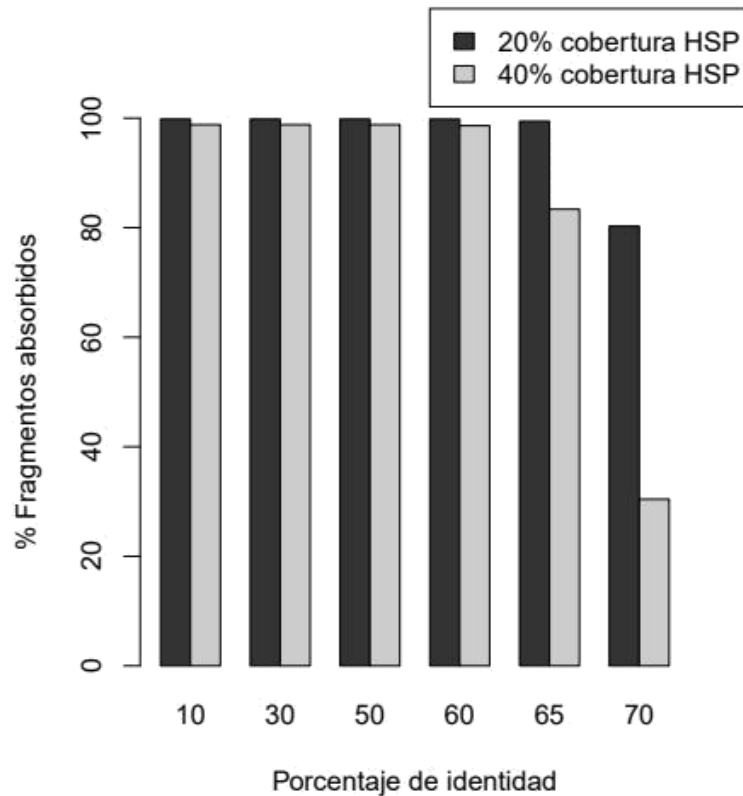


Figura 19. Porcentaje de fragmentos absorbidos obtenidos con diferentes valores de los parámetros IDENT y QCOV.

Una predicción que se deduce de este hecho es que al incrementar el número de fragmentos que no fueron absorbidos, entonces debemos de esperar un incremento en el número de fragmentos ensamblados y también esperaremos un incremento en el tamaño promedio de los fragmentos ensamblados. Esa predicción se puede observar en la Figura 20, donde se grafica el número de fragmentos ensamblados por cada parámetro evaluado de IDENT y QCOV (barras negras y grises) y en la Figura 21 donde se grafica el tamaño de los fragmentos ensamblados, y en esas figuras muestro que al incrementar los valores de los parámetros IDENT y QCOV, también hay un incremento en el número, así como en el tamaño promedio de los fragmentos ensamblados.

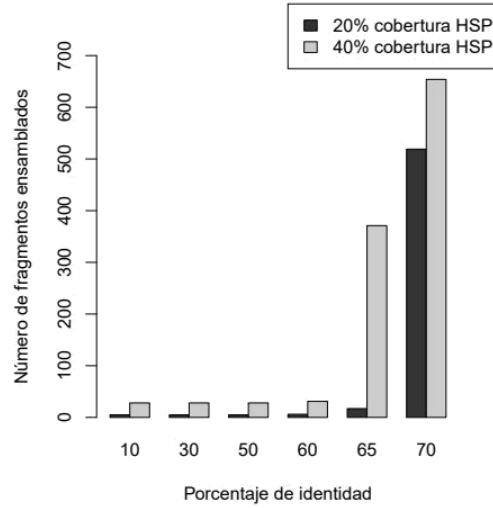


Figura 20. Número de fragmentos ensamblados obtenidos usando diferentes parámetros de IDENT y QCOV.

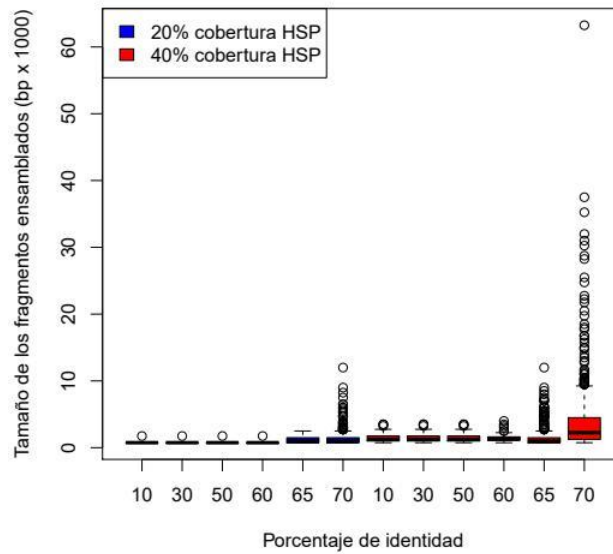


Figura 21. Tamaño de los fragmentos ensamblados obtenidos usando diferentes valores de los parámetros IDENT y QCOV.

La Figura 22 son dos gráficos en donde muestro el número de fragmentos que no fueron absorbidos en las abscisas contra el número de fragmentos ensamblados y el tamaño máximo obtenido y N50 observado en las ordenadas, por cada conjunto de parámetros evaluados (IDENT y QCOV). En La Figura 22A se muestra que el incremento del tamaño máximo observado y el N50 incrementan de manera exponencial conforme incrementa el número de fragmentos no absorbidos, pero el número de fragmentos ensamblados ya no muestra una tendencia en crecimiento (Figura 22B).

Eso es un comportamiento esperado, ya que al incrementar el número de fragmentos que no fueron absorbidos se obtiene una cobertura más completa del genoma, y en teoría el decremento del número de fragmentos ensamblados disminuirá hasta obtener el número de cromosomas, secuencias contiguas o andamios que contiene el genoma examinado, que en este caso es el del patógeno *Clavibacter michiganensis*.

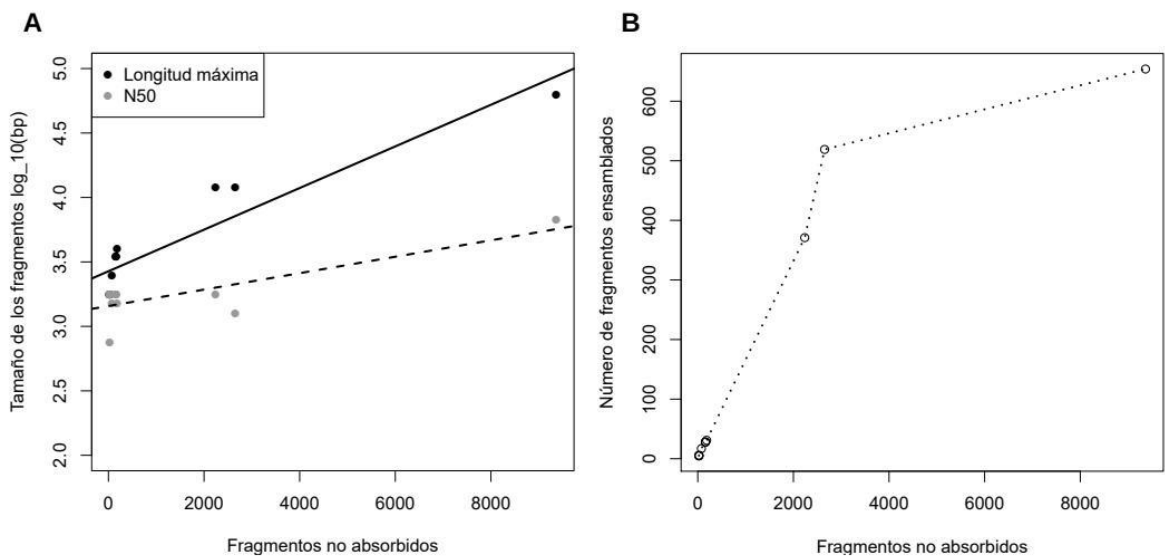


Figura 22. Tamaño de los fragmentos ensamblados y número de fragmentos obtenidos en función del número de fragmentos no absorbidos.

Los resultados obtenidos de estas pruebas de análisis bioinformáticos nos sugieren que los fragmentos ensamblados obtenidos con los parámetros 60% de identidad, 20% de cobertura HSP suman un total de 5 secuencias con una media de tamaño de fragmento ensamblado de 950 nucleótidos. Y los fragmentos ensamblados con los parámetros 60% de identidad y 40% de cobertura HSP suman un total de 31 fragmentos con una media de tamaño de 1580 nucleótidos. Esto es debido a que el total de fragmentos ensamblados obtenidos incrementa notoriamente si pasamos al valor de 65% del parámetro porcentaje de identidad (IDENT) (ver Figura 19). Por lo que seleccionamos los resultados de los análisis con esos parámetros para realizar el mapeo y selección de regiones únicas del genoma de *Clavibacter michiganensis*.

Mapeo y selección de las regiones únicas identificadas del genoma de *Clavibacter michiganensis*. Los fragmentos ensamblados de las pruebas bioinformáticas obtenidas con los parámetros de 60% de identidad y 20% y 40% de cobertura de HSP fueron utilizados para mapearlos en el genoma de *Clavibacter michiganensis*. En la Figura 23 muestro el mapeo de esos fragmentos. En la sección A muestro el genoma de la bacteria en forma lineal con un tamaño de 3,249 kb. En la sección B muestro el transcriptoma anotado y en las secciones C y D muestro las regiones únicas obtenidas usando los parámetros 60% de identidad y 20% cobertura HSP (C) y 60% de identidad y 40% de cobertura HSP (D).

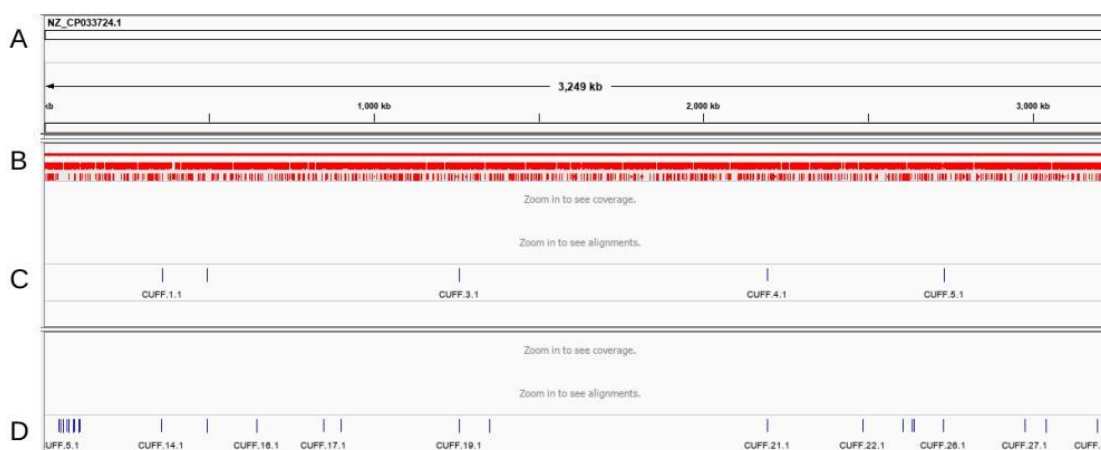


Figura 23. Mapeo de las regiones únicas del genoma de *Clavibacter michiganensis* identificadas con BESTur usando los parámetros 60% de identidad y 20% de cobertura HSP (C) y 40% de cobertura HSP (D).

Después de filtrar las regiones únicas como es descrito en materiales y métodos nos quedamos con 8 secuencias únicas del genoma que utilizamos para diseñar la sonda específica. Utilizamos el programa Primer_3_core para el diseño y obtuvimos 54 sondas con puntuaciones aceptables basándonos en los criterios de selección descritos en materiales y métodos. De las 54 sondas nos quedamos con la sonda mejor optimizada de un tamaño de 26 nucleótidos (5'-AAGTTGCGCCTTTGCTCCGTTGGCAA-3').

VII.- CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se llevó a cabo el diseño de sondas de ADN específicas para la detección selectiva de la bacteria fitopatógena *Clavibacter michiganensis michiganensis*. Para ello se aplicaron estrategias de bioinformática principalmente basadas en el formato de tubería de comandos.

Además, se sintetizaron y caracterizaron los siguientes nanomateriales:

Nanoesferas de oro (AuNSs)

Nanoestrellas de oro (AuNSt)

Nanopartículas con emisiones por conversión ascendente (UCNPs)

Nanopartículas con emisiones por conversión ascendente modificadas con una coraza de ZrO_2 (UCNPs- ZrO_2)

Finalmente, se llevó a cabo la conjugación entre una de las sondas de ADN diseñadas y las nanopartículas con emisiones por conversión ascendente modificadas con una coraza de ZrO_2 . Con ello se obtuvieron nanopartículas luminiscentes funcionalizadas con una sonda de ADN específica para la detección de *Clavibacter michiganensis michiganensis* (UCNPs- ZrO_2 -ADN) con la capacidad de presentar emisiones capaces de ser detectadas a simple vista incluso en condiciones normales de iluminación, como las que podrían ser encontradas de manera cotidiana en los campos de cultivo. Las señales de dichos nanoconjugados fueron observadas. El presente trabajo representa una prueba de concepto, y demuestra el potencial del acoplamiento de dos herramientas tecnológicas modernas: la nanotecnología y la bioinformática, sentando las bases para el

desarrollo de nanosensores para la detección de bacterias fitopatógenas de relevancia agrícola.

VIII.- LITERATURA

- [1] D.I.E.E.S. FIRA, "Panorama Agroalimentario Tomate Rojo 2019," México, 2019. [Online]. Available: <https://www.inforural.com.mx/fira-panorama-agroalimentario-tomate-rojo-2019/>.
- [2] W. Arshad, I.- Haq, M. T. Waheed, K. S. Mysore, and B. Mirza, "Agrobacterium-Mediated Transformation of Tomato with rolB Gene Results in Enhancement of Fruit Quality and Foliar Resistance against Fungal Pathogens," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e96979, May 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0096979.
- [3] I. Mraz, P. Beran, and B. Kokoskova, "Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato plants and seeds using ELISA, if and PCR with commercial and own primers," in *Acta Horticulturae*, Nov. 2011, vol. 914, pp. 57–60, doi: 10.17660/ActaHortic.2011.914.7.
- [4] I. Mraz *et al.*, *BIOSOLARIZACIÓN Resultados de investigación sobre el control de Clavibacter*, Primera., vol. 914, no. 12. Celaya, Gto: International Society for Horticultural Science, 2013.
- [5] X. Xu, S. A. Miller, F. Baysal-Gurel, K. H. Gartemann, R. Eichenlaub, and G. Rajashekara, "Bioluminescence imaging of *clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* infection of tomato seeds and plants," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 12, pp. 3978–3988, 2010, doi: 10.1128/AEM.00493-10.
- [6] Aguirre A, *Patología vegetal.*, Limusa. México, 1965.
- [7] M. Palacio, Ana; Aguado, Ana; Cambra, *EL CHANCRO BACTERIANO DEL*

TOMATE Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis, DGA Centr. Aragon, 2010.

- [8] EPPO Global Database, “Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis (CORBMI),” 2020. <https://gd.eppo.int/taxon/CORBMI/distribution>.
- [9] J. L. Martínez Creuz, “Manejo de Patosistema Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis Smith., con Bacillus subtilis Cohn., en Tomate de Cáscara Physalis ixocarpa Brot., Bajo Condiciones de Invernadero,” 2016.
- [10] J. Borboa Flores *et al.*, “Detección de Clavibacter michiganensis subespecie michiganensis en el tomate del estado de Sonora, México,” *Rev. Fitotec. Mex.*, vol. 32, no. 4, pp. 319–326, 2009, Accessed: Jun. 09, 2020. [Online]. Available: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802009000400011&lng=es&nrm=iso&tlng=es.
- [11] J. Dreier, A. Bempohl, and R. Eichenlaub, “Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis,” *Phytopathology*, vol. 85, no. 4, pp. 462–468, 1995, doi: 10.1094/Phyto-85-462.
- [12] M. D. R. Mark L. Gleason, Ron D. Gitaitis, “Recent Progress in Understanding and Controlling Bacterial Canker of Tomato in Eastern North America.,” *Am. Phytopathol. Soc.*, 1993, doi: 10.1094/PD-77-1069.
- [13] D. Burokienė and Institute, “Early detection of Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensi in tomato seedlings,” *Agron. Res.*, vol. 4, pp. 151–154, 2006.
- [14] Z. Özdemir, “DEVELOPMENT OF A MULTIPLEX PCR ASSAY FOR THE SIMULTANEOUS DETECTION OF CLAVIBACTER MICHIGANENSIS subsp. MICHIGANENSIS, PSEUDOMONAS SYRINGAE pv. TOMATO AND XANTHOMONAS AXONOPODIS pv. VESICATORIA USING PURE CULTURES,” *J. Plant Pathol.*, vol. 91, no. 2, pp. 495–497, Jun. 2009, [Online].

Available: <http://www.jstor.org/stable/41998650>.

- [15] R. E. Jens Dreier, Andreas Bempohl, "Southern Hybridation and PCR for Specific Detection of Phytopatogenic *Clavibacter michiganesis* subsp. *michiganesis*."
- [16] A. J. S. Ahammad, J.-J. Lee, and M. A. Rahman, "Electrochemical Sensors Based on Carbon Nanotubes," *Sensors*, vol. 9, no. 4, pp. 2289–2319, Mar. 2009, doi: 10.3390/s90402289.
- [17] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, and P. Estrela, "Introduction to biosensors," *Essays Biochem.*, vol. 60, no. 1, pp. 1–8, Jun. 2016, doi: 10.1042/EBC20150001.
- [18] A. K. Srivastava, A. Dev, and S. Karmakar, "Nanosensors and nanobiosensors in food and agriculture," *Environ. Chem. Lett.*, vol. 16, no. 1, pp. 161–182, Mar. 2018, doi: 10.1007/s10311-017-0674-7.
- [19] R. Abdel-Karim, Y. Reda, and A. Abdel-Fattah, "Review—Nanostructured Materials-Based Nanosensors," *J. Electrochem. Soc.*, vol. 167, no. 3, p. 037554, Jan. 2020, doi: 10.1149/1945-7111/ab67aa.
- [20] G. Maduraiveeran and W. Jin, "Nanomaterials based electrochemical sensor and biosensor platforms for environmental applications," *Trends Environ. Anal. Chem.*, vol. 13, pp. 10–23, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.teac.2017.02.001>.
- [21] M. Azharuddin *et al.*, "A repertoire of biomedical applications of noble metal nanoparticles," *Chem. Commun.*, vol. 55, no. 49, pp. 6964–6996, 2019, doi: 10.1039/C9CC01741K.
- [22] Y. Wang, M. M. Tong, D. Zhang, and Z. Gao, "Improving the Performance of Catalytic Combustion Type Methane Gas Sensors Using Nanostructure Elements Doped with Rare Earth Cocatalysts," *Sensors*, vol. 11, no. 1, pp. 19–31, Dec. 2010, doi: 10.3390/s110100019.

- [23] I. Choi and Y. Choi, "Plasmonic Nanosensors: Review and Prospect," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, vol. 18, no. 3, pp. 1110–1121, 2012, doi: 10.1109/JSTQE.2011.2163386.
- [24] Y. Ye *et al.*, "Upconversion luminescence of NaYF₄:Yb,Er nanocrystals with high uniformity," *J. Rare Earths*, vol. 32, no. 9, pp. 802–805, 2014, doi: 10.1016/S1002-0721(14)60144-7.
- [25] F. Paquin, J. Rivnay, A. Salleo, N. Stingelin, and C. Silva, "Multi-phase semicrystalline microstructures drive exciton dissociation in neat plastic semiconductors," *J. Mater. Chem. C*, vol. 3, no. 207890, pp. 10715–10722, 2015, doi: 10.1039/b000000x.
- [26] S. Mousa, "Biosensors: the new wave in cancer diagnosis," *Nanotechnol. Sci. Appl.*, p. 1, Dec. 2010, doi: 10.2147/NSA.S13465.
- [27] T. Kubik, K. Bogunia-Kubik, and M. Sugisaka, "Nanotechnology on Duty in Medical Applications," *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 6, no. 1, pp. 17–33, Feb. 2005, doi: 10.2174/1389201053167248.
- [28] G. Zhang, *Nanoscale Surface Modification for Enhanced Biosensing*. Cham: Springer International Publishing, 2015.
- [29] F. TELES and L. FONSECA, "Trends in DNA biosensors," *Talanta*, vol. 77, no. 2, pp. 606–623, Dec. 2008, doi: 10.1016/j.talanta.2008.07.024.
- [30] J. Wang, "SURVEY AND SUMMARY: From DNA biosensors to gene chips," *Nucleic Acids Res.*, vol. 28, no. 16, pp. 3011–3016, Aug. 2000, doi: 10.1093/nar/28.16.3011.
- [31] A. Manuscript, "Nanoscale," 2018, doi: 10.1039/C8NR01512K.
- [32] I. V. Safenkova, I. A. Zaitsev, G. K. Pankratova, Y. A. Varitsev, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev, "Lateral flow immunoassay for rapid detection of potato ring rot caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*," *Appl.*

- Biochem. Microbiol.*, vol. 50, no. 6, pp. 675–682, Nov. 2014, doi: 10.1134/S0003683814120011.
- [33] V. G. Panferov, I. V. Safenkova, A. V. Zherdev, and B. B. Dzantiev, “Urchin peroxidase-mimicking Au@Pt nanoparticles as a label in lateral flow immunoassay: impact of nanoparticle composition on detection limit of *Clavibacter michiganensis*,” *Microchim. Acta*, vol. 187, no. 5, p. 268, May 2020, doi: 10.1007/s00604-020-04253-3.
- [34] M. C. Rueda Barrientos, “Sensibilidad de la prueba de InmunoStrips® en la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate,” *Acta Agrícola y Pecu.*, vol. 3, no. 2, pp. 50–57, Aug. 2017, doi: 10.30973/aap/2017.3.2/4.
- [35] M. R. V. Perez *et al.*, “Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Assisted by Micro-Raman Spectroscopy under Laboratory Conditions,” vol. 34, Oct. 2018, doi: 10.5423/PPJ.OA.02.2018.0019.
- [36] S. K. Pal, S. Bandyopadhyay, and S. S. Ray, “Evolutionary computation in bioinformatics: a review,” *IEEE Trans. Syst. Man Cybern. Part C (Applications Rev.)*, vol. 36, no. 5, pp. 601–615, Sep. 2006, doi: 10.1109/TSMCC.2005.855515.
- [37] J. Gauthier, A. T. Vincent, S. J. Charette, and N. Derome, “A brief history of bioinformatics,” *Brief. Bioinform.*, vol. 20, no. 6, pp. 1981–1996, 2019, doi: 10.1093/bib/bby063.
- [38] T. K. Attwood, A. Gisel, N.-E. Eriksson, and E. Bongcam-Rudloff, “Concepts, Historical Milestones and the Central Place of Bioinformatics in Modern Biology: A European Perspective,” *Bioinforma. - Trends Methodol.*, 2011, doi: 10.5772/23535.
- [39] D. L. Wheeler *et al.*, “Database resources of the National Center for Biotechnology Information,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 36, no. SUPPL. 1, pp. 13–

- 21, 2008, doi: 10.1093/nar/gkm1000.
- [40] Thermofisher, "Technical Resources for Oligonucleotides," 2021.
<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/oligonucleotides-primers-probes-genes/custom-dna-oligos/oligo-technical-resources.html>.
- [41] G. Ramírez-García *et al.*, "Theranostic nanocomplex of gold-decorated upconversion nanoparticles for optical imaging and temperature-controlled photothermal therapy," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 384, no. August, p. 112053, 2019, doi: 10.1016/j.jphotochem.2019.112053.
- [42] S. S. Panikar *et al.*, "Ultrasensitive SERS Substrate for Label-Free Therapeutic-Drug Monitoring of Paclitaxel and Cyclophosphamide in Blood Serum," *Anal. Chem.*, vol. 91, no. 3, pp. 2100–2111, 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.8b04523.
- [43] G. Ramírez-García, E. De La Rosa, T. López-Luke, S. S. Panikar, and P. Salas, "Controlling trapping states on selective theranostic core@shell (NaYF₄:Yb,Tm@TiO₂-ZrO₂) nanocomplexes for enhanced NIR-activated photodynamic therapy against breast cancer cells," *Dalt. Trans.*, vol. 48, no. 27, pp. 9962–9973, 2019, doi: 10.1039/c9dt00482c.
- [44] J. R. Reimers, M. J. Ford, S. M. Marcuccio, J. Ulstrup, and N. S. Hush, "Competition of van der Waals and chemical forces on gold-sulfur surfaces and nanoparticles," *Nat. Rev. Chem.*, vol. 1, 2017, doi: 10.1038/s41570-017-0017.
- [45] Al-Askar, A. A., Ghoneem, K. M., Rashad, Y. M., Abdulkhair, W. M., Hafez, E. E., Shabana, Y. M., & Baka, Z. A. (2014). Occurrence and distribution of tomato seed-borne mycoflora in Saudi Arabia and its correlation with the climatic variables. *Microbial biotechnology*, 7(6), 556–569.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12137>.
- [46] Bergna, A., Cernava, T., Rändler, M., Grosch, R., Zachow, C., & Berg, G.

(2018). Tomato seeds preferably transmit plant beneficial endophytes.
Phytobiomes Journal, 2(4), 183-193.