

**TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Desarrollo de ensayos *in vitro*  
para evaluar resistencia a  
*Ralstonia solanacearum* en  
germoplasma de papa**

*Stefanie De Armas*

*Orientadora: Dra. María Inés Siri*

*Laboratorio de Microbiología Molecular, Cátedra  
de Microbiología, DEPBIO*

*Facultad de Química, Universidad de la República*

*Julio, 2017*

---

## RESUMEN

*Ralstonia solanacearum* es una bacteria gram negativa que causa marchitez bacteriana en muchos cultivos dando lugar a pérdidas económicas a nivel mundial. Este fitopatógeno se encuentra ampliamente distribuido en climas tropicales, sub-tropicales y templados, y se caracteriza por presentar un rango de hospederos extremadamente amplio que abarca a más de 200 especies distribuidas en más de 50 familias diferentes. La familia *Solanaceae* es la más afectada, incluyendo varios cultivos de importancia económica como la papa, el tomate, el morrón, la berenjena y el tabaco. En Uruguay, *R. solanacearum* afecta principalmente al cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.). Uno de los componentes fundamentales para alcanzar el control de la enfermedad es la introducción de resistencia al fitopatógeno en el hospedero. Para dicho propósito el Programa de Mejoramiento Genético de Papa de INIA utiliza la especie silvestre uruguaya *Solanum commersonii*, principal fuente de resistencia disponible en el país. En este trabajo en particular se propuso evaluar la resistencia a marchitez bacteriana en germoplasma de papa generado por INIA mediante ensayos *in vitro*, con el fin de contribuir al desarrollo de nuevas herramientas para el estudio de este patosistema. En una primera etapa, se optimizó un ensayo de inoculación de *R. solanacearum* en plantas de papas crecidas en cultivo *in vitro*. Para ello, se evaluaron diferentes variantes: condiciones óptimas para el cultivo de las plantas, método de inoculación, concentración de inóculo y condiciones de incubación de plantas inoculadas. Posteriormente se evaluaron diferentes métodos para realizar el seguimiento del patógeno en las plantas inoculadas. Estos métodos incluyeron evaluación de síntomas, recuento en placa a partir de tejidos infectados, cuantificación por real time PCR y observación de cortes por microscopía confocal utilizando una cepa reportera fluorescente (*R. solanacearum*-Gfp) desarrollada en trabajos anteriores. Como resultado se logró optimizar un ensayo de inoculación *in vitro* para la evaluación de resistencia a *R. solanacearum* en germoplasma de papa. Los ensayos de inoculación *in vitro* permitieron evaluar un mayor número de genotipos en menor tiempo.

En cuanto a los métodos utilizados para realizar el seguimiento del patógeno, se destaca en este trabajo el estudio (no reportado hasta el momento) de la interacción entre *R. solanacearum* y plantas de papa mediante el sistema reportero GFP, permitiendo un exitoso monitoreo del patógeno *in planta*. La aplicación de esta tecnología aporta una alternativa rápida e innovadora para el *screening* de resistencia a *R. solanacearum*.

Los métodos evaluados no permitieron discriminar entre genotipos a nivel de colonización, así como tampoco se lograron correlacionar completamente los resultados de los mismos. Sin embargo, demostraron una adecuada sensibilidad de detección por lo que constituyen herramientas de diagnóstico útiles para el control de esta importante enfermedad en el cultivo de papa.

---

# ÍNDICE

## Contenido

RESUMEN .....	i
ÍNDICE.....	ii
ABREVIATURAS.....	iv
1-INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Generalidades de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	2
1.2 <i>Ralstonia solanacearum</i> : taxonomía y clasificación.....	3
1.2.1 Clasificación en razas.....	4
1.2.2 Clasificación en biovares.....	4
1.2.3 Clasificación filogenética.....	5
1.2.4 Análisis genómicos.....	8
1.3 La marchitez bacteriana ocasionada por <i>R. solanacearum</i> .....	8
1.3.1 Ciclo de vida de <i>R. solanacearum</i> .....	9
1.4 Medidas de control de la enfermedad .....	11
1.4.1 Resistencia del hospedero como método de control.....	13
1.5 Métodos de detección de infecciones latentes.....	14
1.5.1 Método tradicional: aislamiento del patógeno.....	14
1.5.2 Métodos moleculares para la detección de <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	15
1.5.3 Uso de cepas reporteras para la detección del patógeno <i>in planta</i> .....	16
1.6 <i>Ralstonia solanacearum</i> en Uruguay.....	19
2- OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO .....	22
2.1 Objetivo general .....	23
2.2 Objetivos específicos .....	23
2.3 Estrategias del presente trabajo.....	23
3-MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
3.1 Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento .....	25
3.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	25
3.3 Optimización de ensayos de inoculación de <i>R. solanacearum</i> sobre plantas <i>in vitro</i> .....	26
3.4 Evaluación de la colonización en plantas inoculadas mediante recuento en placa.....	27

---

3.5 Evaluación de la colonización mediante técnicas de microscopía .....	27
3.6 Seguimiento y cuantificación de <i>R. solanaceum</i> mediante qPCR .....	28
3.6.1 Blanco de detección y condiciones de amplificación.....	28
3.6.2 Determinación de la sensibilidad y eficiencia de la reacción.....	29
3.6.3 Extracción de ADN a partir de plantas infectadas.....	29
3.6.4 Evaluación del efecto matriz.....	31
3.6.5 Cuantificación de <i>R. solanacearum</i> mediante qPCR .....	32
4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
4.1 Optimización de condiciones para la evaluación de resistencia <i>in vitro</i> .....	34
4.5 Seguimiento del patógeno mediante técnicas de microscopía .....	39
4.6 Seguimiento y cuantificación de <i>R. solanacearum</i> mediante qPCR .....	45
4.6.1 Determinación de la sensibilidad y eficiencia de la reacción.....	46
4.6.2 Extracción de ADN.....	47
4.6.4 Cuantificación de <i>R. solanacearum</i> mediante qPCR.....	51
5-APÉNDICES .....	52
1. Medios de cultivo .....	53
2. <i>Buffer</i> de extracción .....	56
AGRADECIMIENTOS.....	57
BIBLIOGRAFÍA .....	58

---

## ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNr	ácido desoxirribonucleico ribosómico
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ARNr	ácido ribonucleico ribosómico
cm	centímetro
<i>Cmm</i>	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato
DO	densidad óptica
dpi	días post inoculación
EtOH	etanol
°C	grados Celsius
<i>Cmm</i>	<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
Co-PCR	<i>Co-operational Polymerase Chain Reaction</i>
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
g	gramo
g/l	gramo/litro
hs	horas
hás/año	hectáreas/año
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
INIA	Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria
nm	nanómetros
μl	microlitro
μg	microgramo
μM	micromolar
mg	miligramo
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
MgCl <sub>2</sub>	cloruro de magnesio
min	minutos
pb	pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PM	peso molecular
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
rep-PCR	<i>repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length</i>
QTLs	<i>Quantitative Trait Loci</i>
rpm	revoluciones por minuto
seg	segundos
SF	Suero Fisiológico
T <sub>m</sub>	temperatura de fusión

---

ton/há  
TTC  
ufc

toneladas/hectárea  
2,3,5-trifeniltetrazolio  
unidad formadora de colonia

---

## **1-INTRODUCCIÓN**

---

## 1.1 Generalidades de *Ralstonia solanacearum*

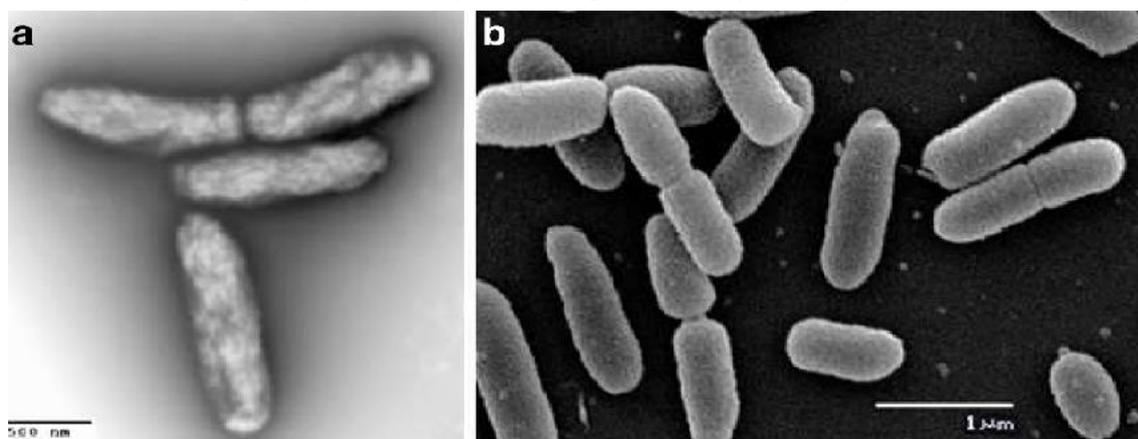
*Ralstonia solanacearum* es el agente causal de la marchitez bacteriana considerada una de las enfermedades de plantas de mayor impacto económico a nivel mundial (Elphinstone, 2005; Mansfield et al., 2012). Esta bacteria fitopatógena se encuentra ampliamente distribuida en climas tropicales, subtropicales y templados (Hayward, 1991), y se caracteriza por presentar un rango de hospederos extremadamente amplio que abarca a más de 200 especies distribuidas en más de 50 familias diferentes (Elphinstone, 2005; Hayward, 1994b). La familia Solanaceae es la más afectada, incluyendo varios cultivos de importancia económica como la papa, el tomate, el morrón, la berenjena y el tabaco. Otros hospederos incluyen, geranio, jengibre, maní, banana, mora, y varias especies de malezas (Denny, 2006). *R. solanacearum* es un bacilo gram negativo, aerobio, móvil, con flagelo polar y una longitud que va desde 0,5  $\mu\text{m}$  a 1,5  $\mu\text{m}$  (Guarisch-Sousa et al., 2016) (Figura 1). Es oxidasa positiva, arginina dihidrolasa negativa, acumula poli- $\beta$ -hidroxibutirato intracelularmente, no provoca la hidrólisis de almidón y su crecimiento es inhibido por bajas concentraciones de sal (Budenhagen et al., 1962; Denny y Hayward, 2001; Denny, 2006). Su temperatura máxima de crecimiento es de 40°C, posee la capacidad de reducir nitrato, producir ácidos a partir de disacáridos y oxidar diversos alcoholes hexosa dependiendo del biovar (Goszczyńska et al., 2000). La supervivencia de la bacteria es afectada por la temperatura, la humedad y otros factores físicos y químicos del suelo. El factor más importante que afecta tanto la interacción planta-patógeno como la supervivencia en los suelos es la temperatura. La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 28 y 30°C (Coutinho, 2005; Hayward, 1964) y en general, el aumento de la temperatura ambiental entre 30-35°C aumenta la incidencia y la tasa de aparición del marchitamiento bacteriano (Hayward, 1991).

*R. solanacearum* se considera uno de los fitopatógenos bacterianos más importantes y devastadores debido a su letalidad, persistencia en los campos, amplia gama de hospederos y gran distribución geográfica (Elphinstone, 2005).

Otra característica destacada es la gran diversidad que presenta este patógeno lo que ha llevado a que su taxonomía y clasificación sea objeto de numerosas revisiones (Peeters et al., 2013).

En los últimos 50 años, la extensa investigación tanto fundamental como aplicada ha establecido a *R. solanacearum* como sistema modelo para el estudio de la patogenicidad bacteriana (Schell, 2000). Este patógeno ha sido uno de los primeros patógenos de plantas en ser enteramente secuenciado (Salanoubat et al., 2002). El desarrollo de patosistemas con plantas modelo, como ser *Arabidopsis thaliana*, ha facilitado los estudios genéticos y moleculares (Mansfield et al., 2012). También se ha reconocido como un microorganismo modelo para el estudio de aspectos evolutivos y de diversificación de la especie.

Por otro lado, dada su importancia a nivel mundial, existe una extensa y activa investigación sobre aspectos más aplicados, incluyendo el mejoramiento genético de los cultivos, métodos de detección y diagnóstico, control biológico y estudios epidemiológicos de dispersión y supervivencia.



---

**Figura 1.** Imagen de una de las cepas de *Ralstonia solanacearum* (UY031) utilizando microscopía electrónica de transmisión (a) y de barrido (b). Adaptado de Guarischi-Sousa et al., 2016.

## 1.2 *Ralstonia solanacearum*: taxonomía y clasificación

Las cepas de *R. solanacearum* pertenecen al orden *Burkholderiales* de la clase  $\beta$ -proteobacteria (Tabla 1-1). El agente responsable de la marchitez bacteriana fue descrito por primera vez en 1896 como *Bacillus solanacearum* por Edwin F. Smith y desde entonces ha recibido varias denominaciones. En 1914 fue renombrado por Smith como *Pseudomonas solanacearum*, denominación que mantuvo durante casi 80 años (Skerman et al., 1980). Posteriormente, en 1992, esta bacteria se clasificó como *Burkholderia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi et al., 1992) en base a análisis de secuencia del gen 16S ARNr, homología ADN-ADN, y composición de ácidos grasos. Finalmente, tres años después, fue nuevamente reclasificada en un nuevo género, *Ralstonia*, para albergar un grupo de homología de ADN distinto al de la especie *Burkholderia cepacia* (Yabuuchi et al., 1995).

Los estudios de hibridación ADN-ADN han revelado que la identidad entre los genomas de *R. solanacearum* suele ser menor que el nivel umbral del 70 % comúnmente esperado dentro de una especie bacteriana (Palleroni y Doudoroff, 1971; Roberts et al., 1990). Gillings y Fahy fueron los primeros en utilizar el término “complejo de especies” para describir la gran variación genética entre los aislamientos, y Taghavi et al. (Taghavi et al., 1996) expandió el concepto de complejo de especies de *R. solanacearum* incluyendo dos especies estrechamente relacionadas de Indonesia, *Ralstonia syzggii* (un patógeno de los árboles de clavo de olor) y el agente de la enfermedad de la sangre del plátano (BDB, *Blood Disease Bacterium*).

Durante las últimas cuatro décadas se han utilizado diferentes criterios y herramientas para evidenciar la diversidad de *R. solanacearum* a nivel infraespecífico. Tradicionalmente, dos sistemas diferentes, raza y biovar, han sido usados para diferenciar las cepas de *R. solanacearum*. Estos sistemas agrupan las cepas en cinco razas según el rango de hospederos susceptibles (Buddenhagen et al., 1962; He et al., 1983; Pegg y Moffett, 1971) y en seis biovars en base a propiedades bioquímicas (Hayward, 1964; 1994a). El sistema de clasificación en razas y biovars es confuso, pues cada biovar contiene cepas con diferentes rangos de hospederos, y varias razas contienen una amplia diversidad de cepas pertenecientes a diferentes biovars. En las últimas décadas se han logrado importantes avances en cuanto al sistema de clasificación utilizando métodos moleculares. Este sistema de clasificación divide al complejo de especies en cuatro grupos principales o filotipos, los cuales están relacionados con el origen filogenético y geográfico de las cepas (Fegan y Prior, 2005).

**Tabla 1-1. Clasificación taxonómica de *Ralstonia solanacearum***

Nivel taxonómico	Nombre
Dominio	Bacteria
Filo	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Betaproteobacteria</i>
Orden	<i>Burkholderiales</i>
Familia	<i>Burkholderiaceae</i>
Género	<i>Ralstonia</i>
Especie	<i>Ralstonia solanacearum</i>

---

### 1.2.1 Clasificación en razas.

Las cepas de *R. solanacearum* se agruparon en cinco razas según el rango de hospederos susceptibles (Buddenhagen et al., 1962; He et al., 1983; Pegg y Moffett, 1971).

La raza 1 constituye el grupo más heterogéneo en lo que refiere a su rango de hospederos, siendo capaz de afectar a una amplia variedad de plantas, incluyendo tomate, papa, berenjena, tabaco, oliva, maní, jengibre, frutilla, eucaliptus, geranio, solanáceas silvestres y otras plantas silvestres. Uno de los problemas de las cepas de la raza 1 es que son fenotípicamente diversas y no son parte de un grupo taxonómico natural (Buddenhagen et al., 1962).

La raza 2 está asociada específicamente a la familia de las bananas (*Musaceae*) y a algunas especies del género *Heliconia*. Cuando se realizaron inoculaciones artificiales se observó también una moderada virulencia en berenjena, morrón, papa y tomate (French y Sequeira, 1970; Janse, 1991).

La raza 3 fue originalmente descrita como patógena de tomate y papa, y débilmente virulenta en otras solanáceas (Buddenhagen et al., 1962). Una de las características más importantes es que las cepas pertenecientes a esta raza están adaptadas a los climas fríos, en comparación con la mayoría de las otras cepas que sólo son capaces de sobrevivir y causar enfermedad en climas cálidos y tropicales. Actualmente se han identificado varias especies que actúan como hospederos asintomáticos, entre ellos se incluyen varias especies de solanáceas silvestres, varias malezas herbáceas no solanáceas y plantas ornamentales como el geranio (Denny, 2006). Por lo tanto, la raza 3 tiene una gama de huéspedes mucho más grande de lo que se pensó originalmente (Buddenhagen et al., 1962). En la raza 4 las cepas son particularmente agresivas en jengibre, pero también producen marchitez en tomate, morrón, berenjena y algunas plantas silvestres (Pegg y Moffett, 1971). La raza 5 causa marchitez en árboles de mora, estas cepas inoculadas artificialmente presentan una virulencia débil también en berenjena y papa (Denny, 2006). Dentro de cada raza pueden existir cepas con diferente nivel de agresividad para cultivares de una misma especie hospedera (Jaunet y Wang, 1999; Mc. Laughlin y Sequeira, 1989; Prior et al., 1990). Otro de los inconvenientes que surge de la clasificación en razas se debe al crecimiento de la diversidad del complejo de especies a lo largo de los años, lo que convierte a este sistema de clasificación en un sistema difícil de manejar, ambiguo y poco fiable como predictor de potencial patogénico de *R. solanacearum*. Esto hace que se puedan producir errores cuando se usa el sistema de razas por las instituciones reguladoras al definir agentes cuarentenarios. Por otra parte, los ensayos de patogenicidad para la determinación de las razas son relativamente fáciles, pero las inoculaciones artificiales son influenciadas por varias variables entre ellas, el cultivar del hospedero, condiciones de crecimiento, inóculo, concentración y método de inoculación; esto puede sobrestimar el rango natural de hospederos (Denny, 2006). El surgimiento de estos problemas permiten concluir a este sistema como confuso e inexacto lo que impide el desarrollo de una imagen precisa de la pato-biología de *R. solanacearum*.

### 1.2.2 Clasificación en biovares.

El sistema de clasificación en biovares fue propuesto originalmente por Hayward (1964). Originalmente se agrupó a las cepas en cuatro biovares según su capacidad de producir ácido a partir de la oxidación de tres disacáridos (celobiosa, lactosa y maltosa) y tres alcoholes hexosa (dulcitol, manitol y sorbitol). El sistema se amplió posteriormente para incluir los siguientes sustratos: la trehalosa, la producción de nitrito a partir de nitrato y la producción de gas a partir de nitrato, lo que permitió clasificar a las cepas en seis biovares (Hayward, 1994a) (Tabla 1-2).

El biovar 2-T (T de tropical), incluido un tiempo más tarde, se refiere a un grupo de cepas metabólicamente más activas y con un rango de hospederos más amplio respecto al biovar 2 original, aisladas de papa en el Amazonas. El biovar 2 original también se puede referir como 2-A. Finalmente, el biovar 5 fue creado para contemplar a las cepas aisladas de morera en China (Hayward, 1994a).

No existe una correlación general entre biovares y razas, salvo para las cepas de raza 3 que se corresponden con el biovar 2 (2-A) y las de raza 5 que son por lo general del biovar 5. Este método ha sido ampliamente adoptado como un rasgo esencial en la caracterización de las cepas de *R. solanacearum* dado que resulta fácil, barato y reproducible, por lo que se continúa usando en muchos laboratorios (Denny, 2006). Sin embargo, este sistema de clasificación tampoco tiene la capacidad de ser predictivo sobre la biología y potencial patogénico de las cepas, ya que, por ejemplo, las cepas de biovares 1 y 3 pueden ser aisladas de hospederos muy variados.

**Tabla 1-2. Diferenciación de las cepas de *Ralstonia solanacearum* en biovares**

Sustratos	Biovares					
	1	2-A	2-T	3	4	5
Manitol	-	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	+	+	-
Dulcitol	-	-	-	+	+	-
Trehalosa	+	-	+	+	+	+
Maltosa	-	+	+	+	-	+
Lactosa	-	+	+	+	-	+
Celobiosa	-	+	+	+	-	+

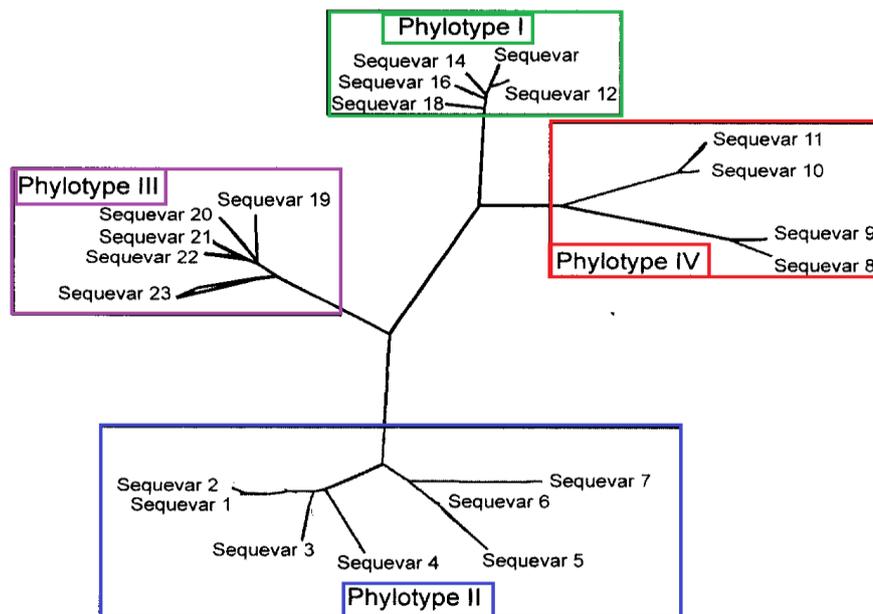
---

### 1.2.3 Clasificación filogenética

A pesar de los continuos esfuerzos en descifrar las relaciones entre los miembros de *R. solanacearum*, así como en describir la diversidad de cepas usando otros métodos de clasificación tradicionales, no se observaron progresos sustanciales desde la implementación del sistema de clasificación de razas y biovares (Cook et al., 1989). Estas dificultades condujeron a la búsqueda de un nuevo sistema de clasificación basado en el análisis del material genético. El trabajo de Cook *et al.* (Cook et al., 1989) y Cook y Sequeira (Cook y Sequeira, 1994) empleando la técnica denominada polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) mostró que *R. solanacearum* se puede dividir en dos grupos o divisiones: la división “Asiática” (división I) comprendiendo las cepas de los biovares 3, 4 y 5 y la división “Americana” (división II) que contiene las cepas de los biovares 1, 2-A y 2-T (Cook et al., 1989). Varios estudios posteriores en los que se emplearon métodos moleculares han confirmado esta dicotomía dentro de *R. solanacearum* (Gillings et al., 1993; Seal et al., 1992; Taghavi et al., 1996). Taghavi *et al.* (Taghavi et al., 1996), usando el análisis de la secuencia del gen que codifica para el ARN ribosomal 16S revelaron la existencia de una subdivisión dentro de la división II que comprende cepas de *R. solanacearum* de Indonesia que incluye a cepas de dos especies estrechamente relacionadas: *Ralstonia syzigii* (un patógeno de los árboles de clavo de olor) y el agente de la enfermedad de la sangre del plátano, conocido como BDB. Dos años más tarde, Fegan *et al.* (1998) realizaron el análisis de la secuencia de la región intergénica 16S-23S y de las secuencias de los genes que codifican para las enzimas poligalacturonasa y endoglucanasa, los cuales apoyaron la existencia de dos divisiones y la existencia de un grupo de cepas originaria de Indonesia. El análisis PCR-RFLP del cluster genético *hrp* (el cual codifica el sistema de secreción de tipo III) demostró que algunas cepas del biovar 1 del sur de África quedaban agrupadas en una subdivisión diferente (Poussier et al., 1999). Posteriormente, el estudio se complementó con el empleo de la técnica AFLP y la secuenciación del gen para ARNr 16S, confirmando la existencia de un grupo de cepas de procedencia africana (Poussier et al., 2000). Este grupo de cepas fue incluida como una nueva subdivisión en la división II (Tejeda, 2006).

En 2005, Fegan y Prior propusieron un nuevo esquema de clasificación para *R. solanacearum* basado en el análisis de la secuencia del espaciador interno transcrito (ITS) localizado entre los genes 16S y 23S del ARNr, el gen de respuesta a la hipersensibilidad y patogénesis B (*hrpB*) y el gen que codifica para la endoglucanasa (*egl*). Este sistema de clasificación divide al complejo de especies en cuatro grupos principales o filotipos, los cuales están relacionados con el origen filogenético y geográfico de las cepas: el filotipo I, comprende aislamientos de Asia y Australia, es equivalente a la división I definida por Cook *et al.* (Cook et al., 1989), e incluye a todas las cepas pertenecientes a los biovares 3, 4 y 5; el filotipo II agrupa los aislamientos de América del Sur y Central, es equivalente a la división II (1989), y comprende a los biovares 1, 2-A y 2-T; el filotipo III corresponde a cepas de África de los biovares 1 y 2-T; y el filotipo IV está representado por cepas de Indonesia pertenecientes a los biovares 1, 2-A y 2-T. Este último filotipo incluye también a cepas de las especies relacionadas *R. syzigii* y el patógeno de banana *Ralstonia celebensis*, también conocido como BDB (*Blood Disease Bacterium*). Los filotipos pueden ser identificados específicamente por una reacción de multiplex-PCR dirigida a la región intergénica (16S-23S ARNr) (Fegan y Prior, 2005). Esta reacción emplea cuatro *primers forward*, cada uno específico para cada filotipo y un *primer reverse* común. También incluye a los *primers* 759/760 (Opina et al., 1997), los cuales identifican a todas las cepas de *R. solanacearum*, BDB y *R. syzigii*. Cada filotipo a su vez está conformado por varios “secuevares”, definidos como grupos de cepas que presentan una secuencia altamente conservada dentro de un área secuenciada. Un secuevar se define sólo si dos o más cepas secuenciadas son similares, una sola cepa no puede constituir un secuevar. Los secuevares son fundamentalmente definidos en base a secuencias parciales del gen de la endoglucanasa (*egl*). El gen de la endoglucanasa ha sido secuenciado

en más de 140 aislamientos de *R. solanacearum* y se han identificado más de 20 secuevares (Fig. 2). Cada secuevar puede a su vez comprender diferentes “líneas clonales”, identificadas mediante técnicas de marcadores moleculares (también llamadas técnicas de *fingerprinting*), como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) o rep-PCR (*repetitive sequence-based Polymerase Chain Reaction*) (Fegan y Prior, 2005).



**Figura 2.** Árbol filogenético generado a partir de datos de la secuencia parcial del gen de la endoglucanasa mostrando las relaciones filogenéticas de secuevares y filotipos. Adaptado de Fegan y Prior (2005).

Fegan y Prior propusieron un esquema de clasificación jerárquica con el fin de reflejar la conocida diversidad dentro del complejo de especies de *R. solanacearum*. Este sistema de clasificación permite analizar simultáneamente cuatro niveles taxonómicos diferentes (especies, filotipo, secuevar y clon), posibilitando la identificación e incorporación al sistema de nuevos secuevares o incluso filotipos a medida que nuevos genotipos son descubiertos. Por tanto, resulta una herramienta muy flexible e informativa para el estudio de la gran diversidad que caracteriza al patógeno, así como para visualizar las relaciones evolutivas dentro del complejo de especies de *R. solanacearum* (Fegan y Prior, 2005).

Esta clasificación en cuatro grupos principales ha sido confirmada por estudios posteriores (Guidot et al., 2007; Sánchez Pérez et al., 2008; Villa et al., 2005). Gracias a los datos filogenéticos en cepas del filotipo II, se ha sugerido que este filotipo debe dividirse en dos subgrupos IIA y IIB (Castillo y Greenberg, 2007; Cellier et al., 2012). Recientemente, Safni *et al.* (Safni et al., 2014) utilizando un enfoque taxonómico polifásico evidenció una mayor diferencia entre filotipos. La información obtenida a partir del análisis filogenético de la secuencia de la región intergénica 16S-23S, de la secuencia del espaciador interno transcrito (ITS) localizado entre los genes 16S y 23S del ARNr y de secuencias parciales del gen de la endoglucanasa (*egl*) y las hibridaciones ADN-ADN, demostró que el complejo de especies de *R. solanacearum* comprende a 3 especies diferentes: *R. solanacearum* (cepas del filotipo II), *R. pseudosolanacearum* (cepas de los filotipos I y III) y *R. syzygii* (cepas del filotipo IV). Esta diferenciación ha sido confirmada posteriormente por estudios a nivel genómico y proteómico (Prior et al., 2016).

---

## 1.2.4 Análisis genómicos

En los últimos años ha aumentado de forma continua el número disponible de genomas de *R. solanacearum* secuenciados gracias al desarrollo de técnicas de secuenciación masiva. En la actualidad se cuenta con 72 cepas secuenciadas (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>), citado el 24 de junio de 2017), encontrándose entre ellas representantes del filotipo I (GMI1000, Y45 y FQY-4), cepas del filotipo II (IIA: K60, CFBP 2957, IIB: IIB4: Po82, IIB3: MolK2 y IIB1: IPO1609, UW 551, UY031), una cepa del filotipo III ((CMR15) y representantes del filotipo IV (*R. solanacearum*, PSI 07; *R. syzygii*, R 24; BDB, R 229) (Gabriel et al., 2006; Guarischi-Sousa et al., 2016; Guidot et al., 2009; Remenant et al., 2010; Safni et al., 2014; Salanoubat et al., 2002). En el año 2002 se secuenció y anotó el primer genoma completo de *R. solanacearum* perteneciente a la cepa GMI1000, contribuyendo al conocimiento sobre este patógeno (Salanoubat et al., 2002). El genoma de *R. solanacearum* (GMI1000) está compuesto por dos replicones circulares de 3.7 Mb y 2.1 Mb con un contenido promedio de G+C de 67%. El replicón más grande, que tiene un origen de replicación típico de los cromosomas bacterianos y lleva los genes de todas las funciones esenciales, se conoce como el cromosoma. El replicón más pequeño tiene un origen de replicación característica de plásmidos y se lo reconoce como megaplásmido. En este replicón se encuentran muchos de los genes asociados a la virulencia y con la adaptación a diversos ambientes, por lo que se concluye que el megaplásmido es una parte esencial presente en todas las cepas de *R. solanacearum*. Esta conclusión también se ve apoyada por el hecho que algunos genes esenciales como los relacionados con la biosíntesis de aminoácidos y cofactores están distribuidos en ambos replicones. Además, muchos genes propios del cromosoma, se encuentran duplicados en el megaplásmido. Estas evidencias sugieren que ambos replicones han co-evolucionado en forma conjunta en esta bacteria (Genin y Boucher, 2004; Salanoubat et al., 2002).

Otro hallazgo es la existencia de regiones que presentan un uso alternativo de codones (ACURs) y un sesgo importante en el contenido G+C respecto al resto del genoma. Se han detectado 91 ACURs de entre 3 y 20-kb que abarca más del 7% del genoma de GMI1000 (Genin y Boucher, 2004).

Cabe destacar que todos los genomas secuenciados hasta el momento también consisten en dos unidades replicativas, un cromosoma y un megaplásmido, que juntos codifican aproximadamente 5000 proteínas (Safni et al., 2014).

La disponibilidad de este gran número de genomas resulta esencial para poder realizar comparaciones a gran escala y generar conocimiento sobre los determinantes genéticos que intervienen en la patogenicidad y en la especificidad de hospederos, así como profundizar en los aspectos evolutivos y de diversificación de *R. solanacearum*.

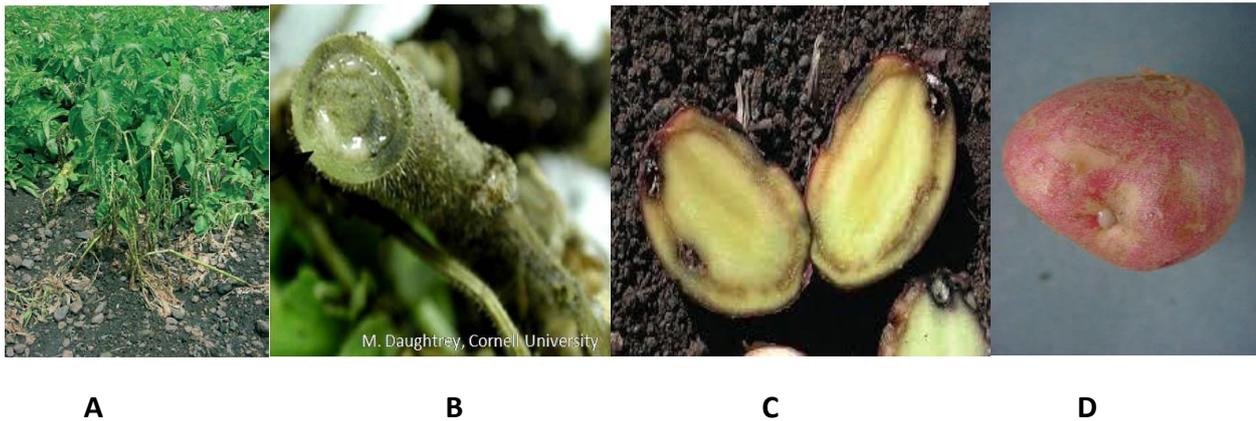
## 1.3 La marchitez bacteriana ocasionada por *R. solanacearum*

*R. solanacearum*, el agente causal de la marchitez bacteriana, es reconocido como uno de los patógenos de plantas más destructivos. En particular para el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.), la “marchitez bacteriana” (también es conocida como “murchera” o “podredumbre parda”) constituye la enfermedad de origen bacteriano más importante, produciendo daños sobre el follaje y los tubérculos, restringiendo la producción y pudiendo ocasionar importantes pérdidas económicas (Allen et al., 2001; Elphinstone, 2005).

El primer síntoma provocado es un marchitamiento de las hojas superiores las cuales adquieren progresivamente una coloración bronceada. Luego, se observa un marchitamiento generalizado que

---

puede eventualmente culminar con la muerte de la planta. Al cortar el tallo, se observan exudados en la zona vascular. Los tubérculos, dependiendo del estado de desarrollo de la enfermedad, pueden manifestar síntomas externos o no, en cuyo caso se observan exudados de la bacteria, a menudo emergiendo de los ojos y de los estolones. En el interior del tubérculo se observa exudados en la zona vascular, así como también se observa una coloración parda del anillo vascular y de los tejidos próximos, principalmente en la zona cercana al estolón. Al evolucionar la enfermedad se produce una necrosis del anillo vascular y de los tejidos adyacentes. La entrada de patógenos secundarios contribuye a que se produzca una pudrición total del tubérculo (Thurston, 1963) (Fig. 3).



**Figura 3.** Síntomas típicos de la marchitez bacteriana de la papa causada por *Ralstonia solanacearum*. A: Marchitamiento foliar. B y C: Cortes transversales de tallo y de tubérculos donde se evidencian exudados en la zona vascular. D: Exudados de la bacteria emergiendo de un ojo del tubérculo. A, C y D tomadas de: [http://www.juntadeandalucia.es/export/drupalida/Ralstonia\\_solanacearum.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/export/drupalida/Ralstonia_solanacearum.pdf). B, foto cortesía de M. Daughtrey, Universidad de Cornell.

Las cepas de *R. solanacearum* pertenecientes a los cuatro filotipos son capaces de afectar a los cultivos de papa (Cellier y Prior, 2010). Las cepas pertenecientes al biovar 2 actualmente clasificadas dentro del filotipo II, secuevar 1 (Elphinstone, 2005; López y Biosca, 2005) son las que representan un riesgo de producción en climas templados debido a su capacidad de producir enfermedad en climas fríos a diferencia de otras cepas de *R. solanacearum* que están adaptadas a regiones cálidas y tropicales (Swanson et al., 2005). El rango de hospederos de estas cepas incluye cultivos como tomate, papa, geranio y una variedad de malezas. El patógeno comúnmente causa infecciones latentes, pudiendo alcanzar poblaciones muy altas sin que la planta presente síntomas (Elphinstone et al., 1998; Swanson et al., 2005). Este fenómeno constituye una importante vía de diseminación de la enfermedad, debido a la posibilidad de exportar a otras partes del mundo tubérculos-semilla infectados de forma latente. Estos tubérculos al ser sembrados en regiones cálidas darán lugar a plantas que rápidamente se marchitarán y morirán (Allen et al., 2001).

### 1.3.1 Ciclo de vida de *R. solanacearum*

*R. solanacearum* presenta dos fases o estadios fisiológicos en su ciclo de vida, una fase saprófita en el ambiente y una fase adaptada a la patogenicidad en el hospedero (Denny et al., 2005).

---

Aunque generalmente se considera como un patógeno vegetal, *R. solanacearum* se comporta principalmente como una bacteria saprófita capaz de sobrevivir durante largos períodos de tiempo en diversos hábitats naturales como las aguas superficiales y diferentes tipos de suelos. Por lo tanto, requiere funciones específicas para que pueda utilizar una variedad de sustratos orgánicos como fuentes de energía y para hacer frente a los compuestos tóxicos que a menudo están presentes en los suelos (Genin, 2004).

Debido a que el suelo puede ser considerado como un entorno oligotrófico (Williams, 1985), la capacidad del patógeno de sobrevivir en el mismo depende de su habilidad para resistir la falta de nutrientes, la deshidratación y la exposición a metales pesados (Van Elsas, 1993; Acea, 1988). La supervivencia de *R. solanacearum* por largos períodos en el suelo y en agua también se atribuye a su capacidad de entrar en un estado de latencia denominado *viable pero no cultivable* (Grey y Steck, 2001). En este estado la bacteria es viable pero es incapaz de dividirse lo suficiente como para detectarse en un medio de crecimiento no selectivo. Las condiciones que han sido encontradas para inducir este estado de latencia dependen de cada especie; entre ellos se incluyen el *stress* osmótico, los cambios de temperatura, la desecación, la falta de nutrientes, y la exposición a cobre (Grey and Steck, 2001).

También se ha asociado la supervivencia a largo plazo con la presencia de la bacteria en determinados sitios denominados sitios protegidos, donde la bacteria puede sobrevivir entre las siembras sucesivas de un cultivo susceptible (Hayward, 1991). Estos sitios incluyen restos vegetales, tubérculos de papa infectados de forma latente (Graham et al., 1979), las capas de suelo más profundas (Graham y Lloyd, 1979; Kishun y Sohi, 1982) y la rizósfera de las raíces de las malezas (Granada y Sequeira, 1983). *R. solanacearum* tiene la capacidad de sobrevivir en distintas especies de plantas silvestres, las cuales permanecen asintomáticas (Coutinho, 2005; Elphinstone, 1996; Janse et al., 2004; Pradhanang et al., 2000a). Entre ellas se destaca *Solanum dulcamara*, una Solanácea muy abundante presente en las orillas de los ríos y que puede actuar como reservorio del patógeno (Elphinstone et al., 1998; Caruso et al., 2005). En el corto plazo, la supervivencia en el suelo está controlada principalmente por la humedad y la temperatura. Otros factores que también pueden influir son el tipo de suelo, el contenido de materia orgánica, el nivel de nutrientes, y la biota microbiana presente (Coutinho, 2005, Hayward, 1991).

Luego de sobrevivir y diseminarse en el ambiente, *R. solanacearum* es capaz de iniciar un proceso infeccioso bajo condiciones ambientales favorables y la presencia de un hospedero susceptible. La bacteria es capaz de entrar en los tejidos de la raíz a través de heridas, extremos radiculares o sitios de emergencia de las raíces secundarias (Genin, 2010). Una vez dentro de la planta, la bacteria invade el sistema vascular, distribuyéndose a los vasos del xilema donde se multiplica activamente y produce grandes cantidades de exopolisacáridos. Esto provoca el taponamiento de los conductos lo que conduce al marchitamiento de la planta ante una falta de hidratación celular. A medida que la población bacteriana aumenta el marchitamiento se hace generalizado pudiendo culminar con la muerte de la planta. Durante la última etapa de la infección, un porcentaje significativo de células en la planta entran en un estado de dormancia o latencia. Este porcentaje aumenta a más del 99% luego de que la planta está sometida a una extensa necrosis. Una vez que las bacterias en estado de latencia retornan al suelo se activan en respuesta a algún cambio en el ambiente como ser el contacto con la rizósfera de un nuevo hospedero susceptible (Grey y Steck, 2001) (Figura 4).



**Figura 4.** Ciclo infeccioso de *Ralstonia solanacearum*. (a) Microscopía electrónica de la cepa de *R. solanacearum* GM11000. (b) Observación con microscopio confocal de la bacteria (en rojo) atacando la superficie de las células de la planta. (c) Visualización de cepa fluorescente de *R. solanacearum* en la superficie de la raíz de una planta de tomate mediante microscopía de fluorescencia. (d) Flujo bacteriano a partir de un tallo de tomate en agua. (e) Exudado en la zona vascular luego de un corte transversal. Esquema adaptado de Genin (2010), extraído de Siri (2010).

## 1.4 Medidas de control de la enfermedad

El control de *R. solanacearum* es difícil debido a que es un patógeno de suelo capaz de sobrevivir largos períodos de tiempo en el mismo, especialmente en las capas más profundas, tiene una amplia gama de hospederos, se disemina a través del agua y presenta una gran variación biológica (Martin y French, 1985). Además algunas cepas de *R. solanacearum*, más precisamente las cepas pertenecientes al filotipo IIB, secuevar 1 presentan la capacidad de producir infecciones latentes asintomáticas, debido a la multiplicación lenta de la bacteria en los tejidos (Elphinstone et al., 1998; Swanson et al., 2005). Este fenómeno representa un importante riesgo de diseminación de la enfermedad para el caso de la producción de tubérculos-semilla y constituye una de las principales dificultades en el control de este patógeno. Por otra parte, distintas especies de plantas silvestres pueden funcionar como reservorio del patógeno por la ocurrencia de infecciones latentes en las mismas, lo que contribuye a mantener al patógeno en el ambiente dificultando el manejo de la enfermedad. Por último, otro aspecto a tener en cuenta es la ausencia de un alto grado de resistencia genética estable en cultivares comerciales de papa y la dificultad de las especies tetraploides como la papa para incorporar genes de resistencia en programas de mejoramiento (Boshou, 2005).

No existe una única estrategia de control para esta enfermedad. Un buen manejo integrado de esta enfermedad, a través del empleo de diversas estrategias de control, puede conducir a su reducción significativa e incluso a su erradicación (French, 1994).

---

En áreas donde no se sabe si la bacteria está presente, la primera estrategia es prevenir la introducción y, si es introducida inadvertidamente, prevenir el subsecuente movimiento del patógeno. En Estados Unidos, se han constatado varias introducciones de cepas de *R. solanacearum* IIB1 a partir de la importación de cortes de geranios infectados provenientes de Guatemala y Kenia (Williamson et al., 2002). Por este motivo, las regulaciones gubernamentales han incluido tolerancia cero para este tipo de cepas, siendo incluidas en la lista de agentes de la Ley Agrícola de 2002 sobre Bioterrorismo del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2004). Esta tolerancia cero incluye el refuerzo de las regulaciones de cuarentena, protocolos de saneamiento y controles diseñados para evitar la introducción de cortes de geranios infectados producidos en otros países (Champoiseau et al., 2009). Este patógeno también es considerado una bacteria de cuarentena incluida en la lista A2 de la Unión Europea (Lambert, 2002).

En las regiones donde el patógeno ya está establecido, las prácticas culturales pueden ser efectivas con ciertas condiciones. Estas prácticas incluyen la rotación de cultivos con plantas no hospederas. Las rotaciones de 2 a 5 años producen una disminución de la incidencia de la enfermedad, pero las rotaciones de períodos cortos parecen ser inefectivas. Otras prácticas culturales que se recomiendan para el control de esta enfermedad incluyen la eliminación de malezas silvestres, el control de nemátodos, plantar en suelos libres del patógeno, remover restos del cultivo donde el inóculo persiste, seleccionar apropiadamente la época de siembra para evitar el calor, arar profundamente las zonas que han sido infectadas, drenar satisfactoriamente el suelo y administrar la irrigación del campo antes y después de la temporada del cultivo (Champoiseau et al., 2009). En áreas donde el patógeno está presente pero todavía no establecido en todas partes, son muy importantes los controles sanitarios del cultivo para mantener las áreas no infectadas limpias. Las prácticas sanitarias incluyen plantar semillas certificadas como libres de patógeno, desinfectar todos los equipos antes de cambiar de campo de cultivo, controlar el flujo de agua y nunca usar aguas superficiales para irrigar (Champoiseau et al., 2009).

Otras medidas de control ampliamente utilizadas incluyen métodos químicos, físicos y biológicos. Los tratamientos químicos son muy destructivos a nivel ambiental, difíciles de aplicar, costosos e inefectivos a largo plazo, lo que limita mucho su uso. Se han observado diversos resultados lo que sugiere que los efectos pueden depender del tipo de suelo (Saddler, 2005; Champoisea et al., 2009). Los tratamientos del suelo como la modificación del pH, la solarización, la aplicación de polvo blanqueador estable, el agregado de inductores de la resistencia de la planta (por ejemplo acibenzolar-S-methyl), el agregado de aceites esenciales, el agregado de diversos fertilizantes y ácido fosfórico, han mostrado una reducción en la concentración bacteriana y de la severidad de la enfermedad en escalas menores (Champoiseau et al., 2009; Michel y Mew, 1998). Los inconvenientes de estos métodos incluyen el daño ambiental, los altos costos y el trabajo laborioso. Una estrategia de control alternativa es el control biológico. El interés por el control biológico se ha incrementado debido a las preocupaciones sobre el uso general de los productos químicos (Whipps, 2001). Los agentes de control biológico utilizados incluyen bacterias antagónicas o mutantes no virulentos de *R. solanacearum* (Saddler, 2005). Estos agentes son potencialmente auto-sostenibles, se extienden por su propia cuenta después del establecimiento inicial, reducen la entrada de recursos no renovables y suprimen la enfermedad a largo plazo sin dañar el medio ambiente (Quimby et al., 2002; Whipps y Gerhardson, 2007). Los mecanismos empleados por los agentes de control biológico abarcan diversas interacciones tales como la competencia por los nutrientes y espacio, antibiosis, el parasitismo y la resistencia sistémica inducida (Agrios, 2005; Cook y Baker, 1983). Si bien se han obtenido resultados prometedores bajo condiciones controladas, aún no fueron confirmados en el campo (Saddler, 2005).

---

### 1.4.1 Resistencia del hospedero como método de control

En ausencia de estrategias eficaces para erradicar *R. solanacearum* de suelos infectados y el agua, el uso de variedades resistentes parece ser la mejor estrategia de control de la enfermedad (Huet, 2014). Sumado a la aplicación de buenas prácticas de producción y de medidas preventivas, el contar con el respaldo de un genotipo con cierto grado de resistencia de campo contribuye a disminuir las pérdidas económicas brindando una mayor seguridad productiva (Fock et al., 2000). Los cultivos con resistencia a *R. solanacearum* en la familia *Solanaceae* aparecen vinculados a las condiciones climáticas (Hayward, 1991) y este éxito limitado se debe a todos los obstáculos que los cultivares resistentes deben superar. El desarrollo de variedades resistentes a la marchitez bacteriana plantea varios desafíos que deben alcanzarse para asegurar una efectiva contribución al control de la enfermedad. En primer lugar, el cultivo debe combinar resistencia duradera con características agronómicas deseables. En segundo lugar, los cultivares resistentes deben ser capaces de hacer frente a la diversidad de las zonas agroecológicas donde la bacteria está presente y a la alta variabilidad genética de las cepas de *R. solanacearum*. En tercer lugar, los cultivos de alta resistencia deben ser priorizados para evitar una mayor diseminación de *R. solanacearum* debido al uso de plantas tolerantes que albergan al patógeno sin mostrar síntomas de la enfermedad. Finalmente, las fuentes disponibles de resistencia resultaron ser poligénicas, lo que dificulta la transferencia de un alto número de genes a los cultivares que, además, pueden estar vinculados a rasgos indeseables (Denny, 2006). Se han identificado varios QTLs (*quantitative trait loci*) controlando la resistencia a la marchitez bacteriana en tomate (Mangin et al, 1999; Wang et al de 2000, 2013; Carmeille et al., 2006), en tabaco (Qian et al., 2013) y en berenjena (Lebeau et al., 2013). En tomate, la resistencia poligénica a la marchitez bacteriana en el cultivar Hawaii 7996 (Grimault et al., 1995) fue sugerida a ser específica de cepa (Wang et al., 2000) y, más recientemente, se planteó la hipótesis de que los QTLs en Hawaii 7996 pueden desplegar una resistencia específica de filotipo (Carmeille et al., 2006). En papa se han encontrado relativamente pocas fuentes de resistencia a *R. solanacearum*. Entre las especies silvestres con cierto grado de resistencia se incluyen: *Solanum raphanifolium*, *Solanum chacoense*, *Solanum microdontum*, *Solanum sparsipilum*, *Solanum stenotomum*, *Solanum multidissectum* y *Solanum commersonii* (Boshou, 2005). También se ha observado resistencia en accesiones de la especie cultivada diploide *Solanum phureja*, sin embargo, la resistencia resultó ser dependiente de la temperatura y solo efectiva en climas fríos (French y De Lindo, 1982). Se han desarrollado algunos cultivares tolerantes: "Achat", de origen alemán y cultivares derivados del germoplasma del Centro Internacional de la Papa (CIP) como el cultivar "Molinera" (Boshou, 2005). La gran variabilidad genética que caracteriza a *R. solanacearum* y la influencia de las condiciones ambientales sobre la respuesta de defensa de la planta constituyen las principales dificultades en la obtención de cultivares con resistencia duradera (Anguiz y Mendoza, 1997). Por otra parte, se debe tener en cuenta el riesgo que conlleva el uso de variedades tolerantes, ya que pueden estar infectadas por la bacteria pero no presentar síntomas. Los tubérculos infectados de forma latente, pueden producir severos brotes de la enfermedad cuando son sembrados en condiciones más favorables (Ciampi y Sequeira, 1980; Hayward, 1991) promoviéndose de esta forma la diseminación de la enfermedad (Priou et al., 2001, Priou et al., 2005). El diagnóstico precoz de *R. solanacearum* juega un papel fundamental en varias de las medidas que involucra el control integrado de la enfermedad. Para poder implementar criterios de selección más exigentes en los programas de mejoramiento se requiere de métodos de detección confiables y suficientemente sensibles, que contribuyan a evitar la diseminación y propagación de la enfermedad en el cultivo.

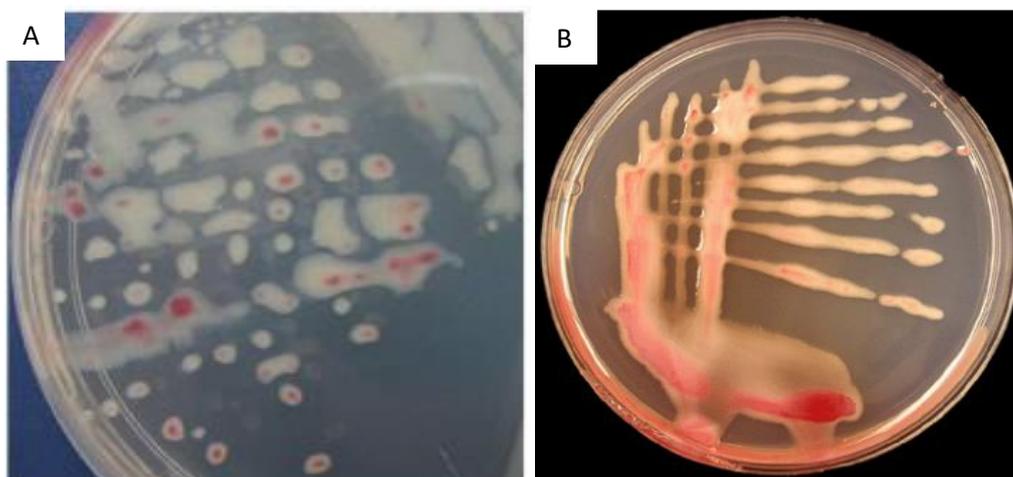
---

## 1.5 Métodos de detección de infecciones latentes

### 1.5.1 Método tradicional: aislamiento del patógeno

El aislamiento a partir de plantas con síntomas es relativamente sencillo, y puede realizarse directamente en el medio Phi con TTC (Kelman, 1954) (Apéndice 1). Este medio diferencial permite distinguir las colonias de *R. solanacearum* por su apariencia típica: colonias con forma irregular, blancas lisas con patrones rojos en espiral (Figura 5). Generalmente, el aislamiento a partir de tallos con síntomas produce un cultivo puro de la bacteria después de una incubación por 48 horas a 28°C. Sin embargo, el aislamiento a partir de plantas asintomáticas resulta dificultoso porque la presencia de otras bacterias puede competir con el crecimiento de *R. solanacearum*, principalmente si se encuentra en bajo número. En estos casos se recomienda utilizar un medio semi-selectivo como el mSMSA (Englebrecht, 1994 modificado por Elphinstone et al., 1996), el cual generalmente suprime la flora acompañante lo suficiente para que *R. solanacearum* sea detectada cuando se encuentra presente a una concentración de hasta 100-500 ufc/g de tejido (Denny, 2006).

Las principales limitantes de los métodos basados en el aislamiento de *R. solanacearum* en cultivo son: i) el tiempo necesario para el crecimiento de la bacteria en medios selectivos (7-10 días en medio mSMSA), y ii) la presencia de flora acompañante que puede llegar a interferir con la detección de las colonias de interés. Sin embargo, incluso cuando otros métodos de detección son usados, el cultivo del patógeno es necesario para confirmar la viabilidad de la bacteria y proveer una cepa pura para la confirmación de identidad y para ensayos de patogenicidad (Denny, 2006).



**Figura 5.** Morfología típica de las colonias de *R. solanacearum* en medio Phi con TTC, luego de una incubación de 48 hs a 28°C: A y B) colonias con forma irregular, blancas lisas con patrones rojos en espiral (Kelman, 1954). A, imagen extraída de Siri (2010) y B, foto cortesía de P. Champoiseau, Universidad de Florida.

---

### 1.5.2 Métodos moleculares para la detección de *Ralstonia solanacearum*

Los métodos moleculares para detectar *R. solanacearum* se basan en la hibridación de sondas o cebadores de PCR a secuencias específicas del patógeno.

Estos métodos presentan numerosas ventajas frente a otros métodos clásicos de detección: no se requiere purificar ni aislar al patógeno, se logran mejores niveles de sensibilidad y especificidad, y se requieren menores tiempos de análisis (Denny, 2006).

En la actualidad los métodos basados en PCR han sido incorporados al análisis de rutina en la mayoría de los laboratorios de diagnóstico de los países desarrollados. Sin embargo, en muchos países aún no se ha logrado introducir esta tecnología debido principalmente a restricciones de equipamiento y capacitación (Borboa et al., 2009; Iglesia et al., 2008).

En 1992 fue reportado el primer método de detección de *R. solanacearum* por PCR (Seal et al., 1992). A partir de entonces, han surgido diversas variantes de la reacción de PCR convencional, dirigidas a lograr una mayor sensibilidad, especificidad y aplicabilidad sobre distintas muestras ambientales. Entre estas variantes se encuentran: multiplex-PCR, Nested-PCR, Co-PCR y PCR en tiempo real (Caruso et al., 2003; Poussier y Luissetti, 2000; Stulberg et al., 2015; Weller et al., 2000).

La selección adecuada de las secuencias diana es esencial en el desarrollo de un ensayo de PCR. La misma debe ser conservada dentro de las especies o del grupo infraespecífico deseado (por ejemplo, filotipo o raza), y ausente en todas las otras bacterias. Los *primers* deben ser probados en tantas cepas de *R. solanacearum* y especies relacionadas como sea posible, para determinar la probabilidad de falsos positivos o falsos negativos de detección. Los *primers* también deben ser probados en varios laboratorios para evaluar el efecto de las pequeñas diferencias en las condiciones de preparación y reacción de la muestra (Denny, 2006).

Las variantes de la reacción de PCR desarrolladas utilizan *primers* dirigidos a diversos blancos de detección, incluyendo el gen del 16S ADN, regiones intergénicas (ITS) en el operón ARNr y varios genes funcionales (Boudazin et al., 1999.; Pastrik y Maiss, 2000; Pastrik et al., 2002; Poussier y Luissetti, 2000; Poussier et al., 2000; Schonfeld et al., 2003 Seal et al., 1993; Seal et al., 1999).

Varios protocolos de PCR y diferentes *primers* se han descrito para la detección de todas las cepas de *R. solanacearum* (Seal et al., 1993; Elphinstone et al., 1996; Opina et al., 1997; Fegan et al., 1998; Boudazin et al., 1999; Pastrik y Maiss, 2000; Poussier and Luissetti, 2000; Weller et al., 2000). Sin embargo, dada la diversidad que presenta este patógeno, se ha visto que algunas de estas reacciones tienen baja especificidad lo que introduce el riesgo de que ocurran falsos negativos o falsos positivos de detección (Arahal et al., 2004). Por otro lado, se han diseñado reacciones de PCR dirigidas a detectar grupos específicos de cepas de *R. solanacearum* (Fegan et al., 1998; Pastrik et al., 2002; Poussier y Luissetti, 2000; Seal et al., 1999). Específicamente la mayoría de los métodos de detección dirigidos a las cepas de *R. solanacearum* que afectan al cultivo de papa (pertenecientes al filotipo IIB, secuevar 1) están basados en la amplificación de una secuencia de DNA identificada por Fegan y colaboradores (Fegan et al., 1998), que codifica para un elemento genético móvil. Este blanco de detección es potencialmente inestable, lo que limita la confiabilidad y especificidad del método, por tanto, resulta importante desarrollar nuevos métodos dirigidos a otras secuencias específicas para la detección de cepas de *R. solanacearum* IIB1 por PCR (Guidot et al., 2009). Recientemente se han diseñado *primers* dirigidos a genes específicos de las cepas pertenecientes al filotipo IIB1, mejorándose la especificidad y sensibilidad de detección (Ferreira, 2012; Stulberg et al., 2015; Stulberg et al., 2016).

La PCR puede ser parcialmente o completamente inhibida por la presencia de sustancias inhibitoras en muestras de suelo, agua o extractos vegetales, dando como resultado falsos negativos. Una de las estrategias utilizadas para solucionar este problema consiste en el uso de un control interno de amplificación, mediante la incorporación de *primers* que co-amplifican un producto que se encuentre

---

presente (o se agrega) en todas las muestras (ej. gen conservado de la planta hospedera) (Glick et al., 2002; Pastrik et al., 2002; Schönfeld et al., 2003; Weller et al., 2000).

Otra estrategia común es el agregado de una etapa de enriquecimiento de la muestra en un medio selectivo previo a la reacción de PCR. Este procedimiento denominado BIO-PCR, logra disminuir los inhibidores potenciales de la PCR y aumentar el número de células diana, mejorando la sensibilidad de detección (Schaad et al., 1995). Además, se ha descrito que el agregado de aditivos para la reacción de PCR puede ayudar a evitar el efecto de las sustancias inhibidoras. Diversos protocolos de extracción de ADN también pueden ayudar a remover las sustancias inhibidoras de la PCR (Poussier et al., 2002).

Por otra parte, se han desarrollado variaciones de la reacción de PCR convencional con el fin de aumentar la sensibilidad de detección. Una de las variantes consiste en la aplicación de dos rondas de amplificación utilizando distintos juego de *primers* en cada una de ellas (Poussier y Luissetti, 2000; Pradhanang et al., 2000b). Esta técnica denominada *Nested-PCR* o PCR anidada posee como desventajas el riesgo de contaminación asociado a la etapa de manipulación del material amplificado en la primera ronda y el mayor tiempo y costo necesarios para la realización de la reacción (Denny, 2006). Otra de las variantes, la *Co-operational PCR*, puede llevarse a cabo fácilmente en una reacción simple, basada en la acción simultánea de tres o más cebadores que producen tres o más amplicones por la combinación de los cebadores y la acción co-operativa de amplicones para la producción del fragmento más grande amplificado por los cebadores externos. La reacción se realiza en un solo tubo, por tanto el riesgo de contaminación es menor que en la técnica *Nested-PCR* (Caruso et al., 2003). En los últimos años se ha desarrollado la técnica de PCR en tiempo real, la cual no solo permite la detección y amplificación del ADN diana, sino también la cuantificación del mismo. La PCR en tiempo real puede generar amplicones de pequeño tamaño (generalmente entre 60 y 70 pb), lo que permite una reacción más eficiente que la PCR estándar, en la que se requiere que los productos de PCR tengan una longitud de al menos 200 pb para permitir la detección mediante técnicas de separación electroforética. Este aumento de la eficiencia y el empleo de sondas específicas de secuencia marcadas con fluorocromos mejoran la especificidad y la sensibilidad de la reacción. Además, este método reduce los tiempos de análisis, ya que elimina la necesidad de etapas de procesamiento post-PCR facilitando la automatización de la técnica. Por tanto, existe un menor riesgo de contaminación debido a que los tubos permanecen cerrados durante todo el ensayo (Orlando et al., 1998; Tse y Capeau, 2003).

### 1.5.3 Uso de cepas reporteras para la detección del patógeno *in planta*

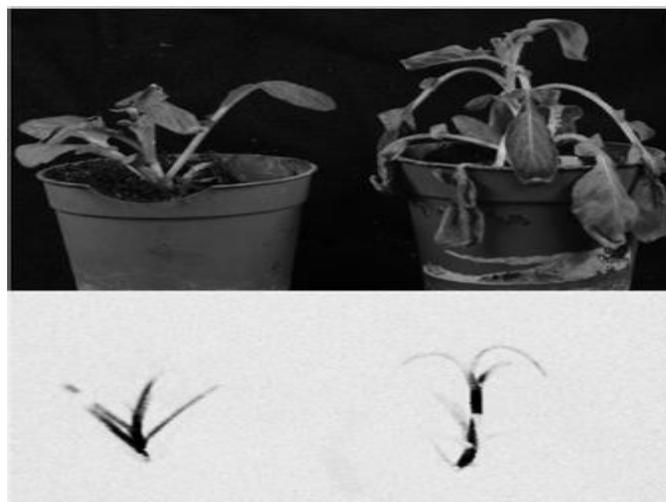
Las cepas reporteras constituyen herramientas valiosas para la visualización y detección *in vivo* de patógenos durante la interacción con sus hospederos. En el caso de *R. solanacearum*, se han desarrollado sistemas reporteros que permiten un fácil seguimiento y cuantificación de la colonización bacteriana *in planta*, contribuyendo al screening de nuevas fuentes de resistencia en programas de mejoramiento (Cruz et al., 2014).

Los sistemas de marcadores luminiscentes se han utilizado durante mucho tiempo como reporteros en células vivas a través de una amplia gama de condiciones ambientales (Greer y Szalay, 2002; Howett et al., 2010). La clonación y expresión de los genes *lux* provenientes de diferentes organismos bioluminiscentes ha permitido el seguimiento de bacterias vivas en los huéspedes así como su cuantificación. Los organismos capaces de emitir luz se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y comprenden un conjunto notablemente diverso de especies. Entre ellos se encuentran las bacterias luminiscentes *Photobacterium luminescens* y *Vibrio harveyi*, así como organismos eucariotas tales como *Photinus* (luciérnaga) y la especie marina *Renilla reniformis* (Greer y Szalay, 2002). La capacidad de

---

emitir luz de estos organismos reside en la presencia en éstos del operón *lux*. Los operones *lux* de los organismos bioluminiscentes tienen una organización de genes común *luxCDABE*; *luxAB* codifica para la enzima luciferasa y *luxCDE* codifica el complejo de ácido graso reductasa responsable de la síntesis de aldehídos grasos para la reacción de luminiscencia (Meighen, 1991). Como todos los requerimientos para la enzima pueden ser proporcionados por cualquier célula viva aeróbica, todo el operón se utiliza como un reportero no disruptivo que espontáneamente emite luz (Monteiro et al., 2012).

Hikichi *et al.* (1999) transformaron la cepa de *Ralstonia solanacearum* OE1-1 con un plásmido que portaba el operón *luxCDABE* para estudiar la translocación bacteriana en plantas de tomate con injerto simple o doble con combinaciones de cultivares resistentes y susceptibles (Hikichi et al., 1999). Unos años más tarde se desarrolló un método de alto rendimiento para evaluar el crecimiento de *Pseudomonas syringae* en planta mediante la inserción del operón *luxCDABE* proveniente de *Photobacterium luminescens* en la bacteria. Este método se utilizó para evaluar resistencia de más de 100 ecotipos de *Arabidopsis* a *P. syringae* (Fan et al., 2008). La luminiscencia emitida por cepas marcadas con el operón *luxCDABE* permite una cuantificación rápida y conveniente del crecimiento bacteriano sin la extracción de tejido, la dilución en serie, el plaqueo y el conteo manual implicados en los ensayos estándar de crecimiento bacteriano por formación de colonias en cultivo en placa a partir de muestras de tejido infectado. En 2012 se demostró que la cepa de *R. solanacearum* GMI1000 portando un operón *lux* sintético completo se podía visualizar *in planta* durante el proceso de infección (Monteiro et al., 2012a). Una ventaja de este sistema es que el sistema reportero se inserta establemente en monocopia en el cromosoma bacteriano en lugar de estar codificado en un plásmido, evitando la pérdida del mismo en condiciones competitivas (por ejemplo, durante la infección de plantas) y las variaciones en el número de copias. Recientemente se mejoró el sistema reportero para asegurar su expresión continua y se introdujo al mismo en la cepa de *R. solanacearum* UY031, la cual es altamente agresiva para la papa (Siri et al., 2011). La estabilidad genética del reportero luminiscente se aseguró mediante el uso del sistema pRC, que permite la integración de elementos genéticos en una región neutra del genoma de *R. solanacearum* (Monteiro et al., 2012b). Para garantizar la alta expresión del gen reportero en *R. solanacearum*, se clonó el promotor constitutivo del cloroplasto *PpsbA*, creando el plásmido pRCG-Pps-lux. Luego de pasos de transformación y selección se obtuvo la cepa UY031 Pps-lux, que lleva una fusión *PpsbA::LuxCDABE* acompañada de un *cassette* de resistencia a la gentamicina insertado en el cromosoma (Cruz et al., 2014). Para cualquier planta infectada con UY031 Pps-lux, la progresión de la luminiscencia en el tiempo siempre mostró una buena correlación con los síntomas de marchitamiento observados. Sin embargo, cargas bacterianas similares (medida por la extensión de los tejidos que emiten luz), correspondieron a una severidad variable de los síntomas en diferentes plantas (Figura 6).



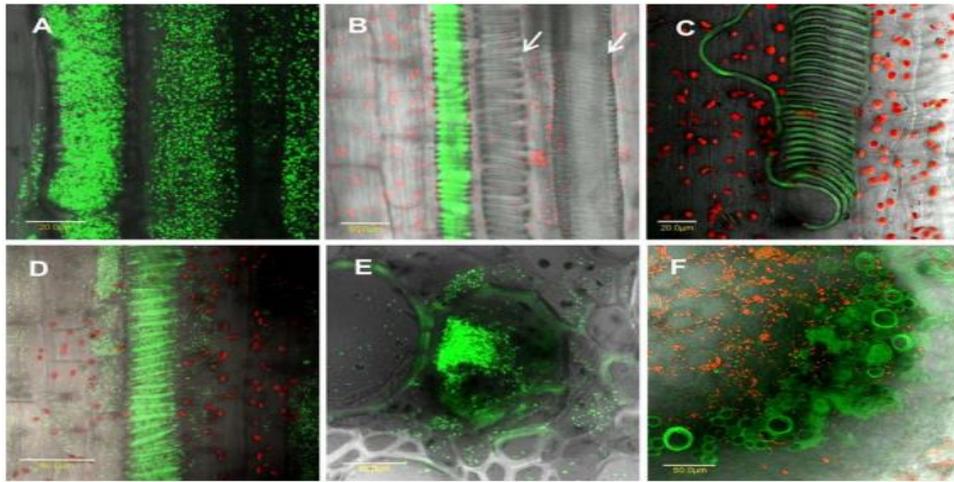
---

**Figura 6.** Plantas con colonización bacteriana comparable pueden mostrar diferentes extensiones de marchitamiento. Las imágenes muestran una imagen de luz (arriba) y la detección de luminiscencia (parte inferior) de dos plantas de *Solanum commersonii* F97 infectadas con UY031 Pps-lux. Se visualizaron dos fenotipos contrastantes. Adaptado de Cruz et al., 2014.

Este nuevo sistema resulta especialmente útil para detectar infecciones latentes en líneas parentales asintomáticas antes de su inclusión en programas de mejoramiento a largo plazo para la resistencia a enfermedades (Cruz et al., 2014). Una de las desventajas que presenta la técnica de bioluminiscencia es que depende de la cinética de absorción celular de los sustratos y no puede utilizarse para seguir células bacterianas individuales o detectarlas en tejidos dañados o células muertas (Kohlmeier et al., 2007).

Otro de los sistemas reporteros utilizados para la detección *in vivo* de la bacteria dentro de la planta es el sistema reportero GFP (proteína verde fluorescente). La proteína verde fluorescente fue aislada de la medusa *Aequorea victoria* y su descubrimiento significó un importante avance para el desarrollo y aplicación de los sistemas reporteros en estudios *in vivo*. La expresión heteróloga de esta proteína aporta a la bacteria la capacidad de emitir fluorescencia sin ningún requerimiento de sustratos específicos. Existen numerosos trabajos en el campo de estudio de las interacciones planta-bacteria, que han utilizado exitosamente esta herramienta para el marcado fluorescente de virus, bacterias y hongos, logrando el monitoreo de su actividad *in planta* a nivel celular (Bendahmane et al., 2002; Campbell et al., 2017; Fan et al., 2011; Hao et al., 2017; Rajasekaran et al., 2008; Wang et al., 2007). Mediante el uso de la proteína verde fluorescente se han estudiado diversos patógenos de plantas, tales como *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*, *Xanthomonas citri* subsp. *citri* y *Dickeya* sp. IPO2254 entre muchos otros (Cubero et al., 2011; Czajkowski et al., 2010; Sabuquillo et al., 2017). En estudios recientes del patógeno *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) se ha reportado el uso del sistema reportero GFP para examinar los patrones de colonización, movimiento e interacción planta-patógeno (Chalupowicz et al., 2012; Lelis et al., 2014) (Figura 7), así como el modo de infección en semillas de tomate (Tancos et al., 2013). Para el caso de *R. solanacearum*, se han reportado algunos trabajos que refieren al uso de esta tecnología como herramienta para el estudio de la patogénesis de esta bacteria (Aldon et al., 2000; Fujie et al., 2010; Kawasaki et al., 2007; Li et al., 2017; Yao y Allen, 2006). Se han ensayado diferentes estrategias para la introducción del marcador fluorescente en *R. solanacearum*, incluyendo la transformación con varios tipos de plásmidos y la integración genómica al azar por mini transposones. En 2007, Kawasaki *et al.* desarrollaron un vector GFP a partir de la modificación de un fago filamentoso que infecta específicamente a *R. solanacearum*, el cuál se mantiene en forma estable por más de 100 generaciones sin selección por antibióticos (Kawasaki et al., 2007). Este vector se utilizó para la generación de un sistema reportero aplicable al monitoreo espacio-temporal del patógeno en el tejido de la planta, contribuyendo al estudio del proceso de infección (Fujie et al., 2009). En los últimos años se ha realizado el aislamiento y la caracterización de nuevos bacteriófagos que infectan al fitopatógeno, los cuales representan valiosos recursos con usos potenciales en el control biológico de la marchitez bacteriana (Bhunchoth et al., 2015; Yamada, 2012).

El estudio de la interacción planta-patógeno mediante el sistema reportero GFP ha abarcado principalmente el estudio de la interacción entre *R. solanacearum* y plantas de tomate, no existiendo actualmente ningún reporte sobre su uso para el monitoreo del proceso de infección en papa. Por lo tanto, la aplicación de esta tecnología para el monitoreo del patógeno sobre el material resultante de programas de mejoramiento de papa, aportaría una alternativa rápida e innovadora para el *screening* de resistencia a *R. solanacearum*.



**Figura 7.** Colonización de plantas de tomate por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* marcada con la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP). La localización de la cepa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* marcada con EGFP en las plántulas de tomate se examinó mediante microscopía confocal a los A) 3 días postinoculación (dpi); B) 7 dpi; C) 15 dpi; D) 30 dpi; E) 7 dpi y F) 15 dpi. Las imágenes se tomaron de tallos cortados longitudinalmente (A - D) y transversalmente (E) y de una hoja marchita (F).

## 1.6 *Ralstonia solanacearum* en Uruguay

En Uruguay *R. solanacearum* afecta principalmente al cultivo de papa, uno de los principales cultivos hortícolas del país. En el período 2014/15 se sembraron 4462 hectáreas de papa, con una producción promedio de 82468 toneladas y un rendimiento de 18 ton/ha (Encuesta Papera, DIEA-MGAP 2014/15). El principal destino de la producción es para consumo fresco. Las condiciones climáticas del país permiten la producción de papa durante todo el año, no obstante, se destacan dos épocas principales de producción, otoño y primavera. La región sur (San José) concentra el 60% del área cultivada de papa con producción de otoño, el noroeste (Tacuarembó) concentra el 20% con producción de primavera y la zona este (Rocha) los otros 20% con producción de verano (Figura 8) (Vilaró et al., 2000).



---

**Figura 8.** Mapa que muestra las principales áreas de producción de papa en Uruguay. Sur: San José (verde); Este: Rocha (rojo); Norte: Tacuarembó (rosa).

En Uruguay, el marchitamiento bacteriano causado por *R. solanacearum* se considera una de las enfermedades más importantes de la papa, causando daños extensos y pérdidas económicas significativas, especialmente cuando no se aplican medidas preventivas de control (Encuesta papera, DIEA-MGAP, 2014/15). Además, constituye un factor limitante para la certificación de papa-semilla nacional, que tiene un requisito de tolerancia cero para este patógeno (INASE). El primer reporte oficial fue registrado en 1974 en el departamento de Rocha y el impacto fue devastador (Canale, 1984). Un segundo brote importante ocurrió en la zafra 2001-2002 cuando el 34% de los predios sembrados fueron afectados (DIEA-MGAP). La incidencia de la enfermedad ha sido variable y se caracteriza por la aparición de severos brotes, que son difíciles de prevenir y controlar. Además, la enfermedad se ha reportado en todo el país, dificultando el mantenimiento de áreas libres de patógeno para la producción de papa.

Un relevamiento llevado a cabo durante la década de 1980 reveló la presencia de cepas que fueron caracterizadas como raza 3, biovar 2 (Canale y Peralta, 1983). Sin embargo, no se realizaron más relevamientos hasta el año 2003. En ese año se inició un relevamiento de las cepas de *R. solanacearum* presentes en Uruguay, generándose una colección de las mismas a partir de muestras de suelo y tubérculos con síntomas típicos de la enfermedad. Las cepas fueron aisladas de las principales áreas de producción de papa de Uruguay. La caracterización de las cepas fue realizada en base a criterios bioquímicos, fenotípicos y genotípicos, revelándose la presencia de cepas pertenecientes al filotipo IIB, secuevar 1 (Siri, 2010; Siri et al., 2011).

Al igual que con otros patógenos bacterianos de plantas, la estrategia de control más eficaz para *R. solanacearum* sigue siendo el uso de cultivares con resistencia duradera. Sin embargo, la resistencia a la marchitez bacteriana en papa parece relativamente inestable a lo largo de los lugares debido a la variación en las condiciones ambientales y a la diversidad de cepas (Boshou, 2005). Las especies silvestres de papa proporcionan una fuente diversa, única y rica de variación genética para el programa de mejoramiento (Bradshaw et al., 2006). Se han hecho extensos esfuerzos para transferir la resistencia a la marchitez bacteriana desde varias especies silvestres relacionadas con la papa cultivada pero desafortunadamente los híbridos sexuales de papa con accesiones de *S. chacoense*, *S. sparsipillum* y *S. multidissectum* lograron sólo un moderado nivel de resistencia, así como algunos rasgos salvajes indeseables, como alto contenido de glicoalcaloides (French et al., 1998; Boshou, 2005). La especie silvestre uruguaya más valiosa para el mejoramiento genético del cultivo de papa es *Solanum commersonii* Dun. Esta especie está ampliamente distribuida en nuestro territorio, y presenta una importante diversidad morfológica y química (Vázquez et al., 1997). Por otro lado, presenta muchos rasgos deseables, como la tolerancia a bajas temperaturas y resistencia a varios patógenos incluyendo *R. solanacearum* (Carputo, et al., 2007, Tozzini et al., 1991). En la estación experimental Las Brujas del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) se lleva a cabo el programa de mejoramiento genético de papa y desde el año 2000 se trabaja en la introducción de resistencia a la marchitez bacteriana en las nuevas variedades. Uruguay constituye el centro de diversidad primario de *S. commersonii*, lo que facilita su disponibilidad. Hoy en día, se cuenta con una colección de germoplasma silvestre de *S. commersonii* presente en diferentes puntos del país conservada en el INIA. Se analizó la diversidad genética dentro de esta colección lo que permitió conocer la distribución de los distintos genotipos y contribuir a su aprovechamiento como fuente de germoplasma (Siri et al., 2009). Esta colección también fue caracterizada por su resistencia a *R. solanacearum* y otras características

---

---

importantes (contenido de glicoalcaloides, ploidía, fertilidad, etc.) (Galván et al., 2007; Pianzola et al., 2005; Siri et al. 2005; 2009). La caracterización del germoplasma permitió identificar genotipos con una respuesta diferencial frente a la infección por *R. solanacearum*: susceptibles, resistentes y tolerantes (Siri et al., 2005; 2011; González et al., 2013). Estos resultados posibilitaron seleccionar las accesiones con mayor resistencia al patógeno para ser usadas como progenitores en los cruzamientos.

Este conocimiento será utilizado como punto de partida para el presente proyecto a los efectos de profundizar en las causas que explican cada tipo de interacción en este patosistema. Se propone evaluar la resistencia a la marchitez bacteriana en germoplasma de papa generado por INIA mediante ensayos *in vitro*, con el fin de contribuir al desarrollo de nuevas herramientas para el estudio de este patosistema.

---

## **2- OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO**

---

## 2.1 Objetivo general

Desarrollar nuevas herramientas para la evaluación de resistencia a la marchitez bacteriana en germoplasma de papa (*Solanum tuberosum* L.).

## 2.2 Objetivos específicos

Optimizar un ensayo de inoculación de *R. solanacearum* en plantas de papa crecidas en cultivo *in vitro*.

Evaluar diferentes métodos para realizar el seguimiento del patógeno en genotipos de papa con diferentes niveles de resistencia a marchitez bacteriana.

## 2.3 Estrategias del presente trabajo

Los ensayos realizados hasta el momento para evaluar la resistencia del germoplasma generado por INIA han implicado la inoculación de las plantas en suelo (Montanelli et al., 1995), la evaluación de los síntomas de la enfermedad a los 28 días posteriores a la inoculación y la detección de infecciones latentes en las plantas asintomáticas mediante amplificación por PCR. Entre las limitantes de este tipo de ensayos se encuentran el número de genotipos a evaluar, la duración de los ensayos y la variabilidad experimental. Con el fin de evitar en cierta medida estas limitantes y contribuir al desarrollo de nuevas herramientas para el estudio de este patosistema, en este trabajo en particular nos propusimos evaluar la resistencia a marchitez bacteriana en germoplasma de papa generado por INIA en condiciones más controladas, utilizando plantas axénicas crecidas mediante cultivo *in vitro*.

En una primera etapa, se optimizó un ensayo de inoculación de *R. solanacearum*. Para ello, se evaluaron diferentes variantes: condiciones óptimas para el cultivo de las plantas, método de inoculación, concentración de inóculo y condiciones de incubación de plantas inoculadas.

Posteriormente se evaluaron diferentes métodos para realizar el seguimiento del patógeno en las plantas inoculadas. Estos métodos incluyeron evaluación de síntomas, recuento en placa a partir de tejidos infectados, cuantificación por real time PCR y observación de cortes por microscopía confocal utilizando una cepa reportera fluorescente (*R. solanacearum*-Gfp) desarrollada en trabajos anteriores (Cruz et al. 2014).

Cabe destacar que los genotipos seleccionados para su caracterización mediante los ensayos *in vitro* presentaron diferente respuesta frente a la infección con *R. solanacearum* en ensayos realizados sobre plantas crecidas en sustrato hortícola e inoculación en suelo (Siri et al., 2011; González et al., 2013; Cruz et al., 2014).

---

## **3-MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### 3.1 Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento

Se utilizaron dos cepas de *R. solanacearum*: la cepa UY036 y la cepa reportera fluorescente (cepa UY031 Pps-GFP) (Cruz et al. 2014).

La cepa UY036 fue aislada en 2003 en el departamento de Tacuarembó, Uruguay a partir de tubérculos de papa naturalmente infectados. Dicha cepa presenta una alta agresividad y pertenece al filotipo IIB, sequevar 1 (IIB1) (Siri et al., 2011). El cultivo esta de cepa se realizó en medio Phi con TTC (Kelman, 1954), incubando las placas a 28°C durante 48-72 hs. La composición y forma de preparación de este medio se detalla en el Apéndice 1.

La cepa reportera fluorescente de *R. solanacearum* UY031 Pps-GFP se desarrolló en trabajos anteriores mediante la integración del sistema reportero GFP acoplado al promotor *PpsbA* (promotor constitutivo del cloroplasto) en el genoma de la cepa UY031. Para ello se utilizó un sistema de vectores que permite de forma estable y directa la integración de cualquier construcción en un sitio permisivo del cromosoma de *R. solanacearum* (Cruz et al., 2014). La cepa lleva la fusión *PpsbA::GFP* acompañada de un *cassette* de resistencia a la gentamicina que permitió el crecimiento de la misma en un medio selectivo. El cultivo de esta cepa se realizó en medio Phi con TTC (Kelman, 1954) suplementado con gentamicina (75 µg/ml), incubando las placas a 28°C durante 48 hs. La composición y los pasos a seguir para la preparación del medio se detallan en el Apéndice 1.

Ambas cepas se encuentran conservadas a -70°C en caldo glucosa peptona casaminoácidos (Hendrick y Sequeira, 1984) con 18% de glicerol.

### 3.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento

En este estudio se utilizaron 11 genotipos con respuesta diferencial frente a la infección por *R. solanacearum* derivados del programa de mejoramiento genético de papa del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, Las Brujas, Uruguay) (González et al., 2013) (Tabla 3-1). También se utilizaron plantas de *Solanum tuberosum* cultivar *Chieftain* como control susceptible.

**Tabla 3-1. Genotipos utilizados en este estudio.**

Genotipos	Descripción	Respuesta
P36	(cmm <sup>a</sup> x cmm)	Tolerante
P79	(cmm x cmm)	Tolerante
P80	(cmm x cmm)	Tolerante
P107	(cmm x cmm)	Tolerante
P121	(cmm x cmm)	Tolerante
06.201.20	(cmm x phu <sup>b</sup> )	Susceptible
08.302.4	(cmm x phu) x tbr <sup>c</sup>	Tolerante
09.506.2	(cmm x phu) x tbr) x tbr	Tolerante
09.509.6	(cmm x phu) x tbr) x tbr	Tolerante
11.201.27	(cmm x phu) x tbr	Tolerante
13.204.34	(cmm x phu) x tbr	Tolerante

---

---

<sup>a</sup> *S. commersonii*

<sup>b</sup> *S. phureja*

<sup>c</sup> *S. tuberosum*

Los genotipos susceptibles son aquellos cuya respuesta frente a la infección por *R. solanacearum* fue altamente susceptible, con un marchitamiento de la planta simultáneo al del control susceptible *S. tuberosum* cultivar *Chieftain*. Por otra parte, los genotipos tolerantes son aquellos cuyas plantas no mostraron síntomas o mostraron ligeros síntomas de marchitez y un retraso en la aparición de los mismos respecto al control. En esta categoría predominan las plantas asintomáticas (> 50%) (Siri et al., 2005; 2011).

Los genotipos de papa fueron micropropagados a partir de esquejes de un solo nudo. En una primer etapa las plantas se crecieron *in vitro* en medio Murashige-Skoog modificado (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 g/l de sacarosa, siendo mantenidas a 24°C con un ciclo de 16 hs de luz y 8 hs de oscuridad. La composición y forma de preparación de este medio se detalla en el Apéndice 1. Una vez que las plantas elongaron hasta generar cuatro o cinco entrenudos (2 a 4 semanas dependiendo del genotipo), se transfirieron esquejes individuales a tubos de vidrio de 30 mm de diámetro y 200 mm de largo conteniendo 45 ml de medio de crecimiento líquido y perlitas usadas como soporte de las plantas. Se evaluaron distintas variantes del medio, así como diferentes soportes de las plantas. Como variantes del medio se evaluó el medio Murashige-Skoog líquido modificado sin sacarosa y suplementado con 30 g/l de sacarosa, así como el agregado del antibiótico tetraciclina (30mg/ml) para evitar el crecimiento bacteriano en el medio. También se evaluaron perlitas de distinto material para comparar su eficacia en cuanto a su flotabilidad y a su capacidad de sostén de las plantas. Las perlitas comparadas fueron las perlitas expandidas, compuestas por un mineral de origen volcánico formado principalmente por silicatos y perlitas de polipropileno.

### 3.3 Optimización de ensayos de inoculación de *R. solanacearum* sobre plantas *in vitro*

Para preparar los inóculos, las cepas utilizadas se cultivaron durante la noche en medio Phi líquido (Kelman, 1954) a 28°C con agitación a 200 rpm. Las células se separaron por centrifugación, se suspendieron en aproximadamente 5 ml de agua y el inóculo se ajustó espectrofotométricamente a una concentración de  $10^8$  ufc/ml (densidad óptica a 600 nm de 0,1). Para obtener una concentración de inóculo de  $10^7$  ufc/ml se realizó una dilución al décimo del inóculo ajustado previamente.

Para la inoculación de plantas de papa crecidas en cultivo *in vitro* se evaluaron diferentes variantes. Por un lado, se compararon dos métodos de inoculación: i) inoculación por sumergido de raíces en una suspensión del patógeno y ii) inoculación directa del patógeno en el medio de cultivo líquido. Para ello, los genotipos de papa crecidos durante dos a cuatro semanas fueron removidos del medio y las raíces de dichas plantas fueron sumergidas en una suspensión de inóculo ( $10^7$  ufc/ml) por 15 min, siendo posteriormente transferidas a los tubos de vidrio conteniendo 45 ml de medio Murashige-Skoog modificado líquido sin sacarosa y sin tetraciclina y perlitas de polipropileno previamente esterilizados (estas variantes fueron las elegidas durante la optimización de condiciones para la evaluación de resistencia *in vitro*). Alternativamente se realizó el método de inoculación directa en el medio de cultivo

---

que consistió en pipetear 100 µl de suspensión bacteriana en el medio Murashige-Skoog modificado líquido sin sacarosa contenido en los tubos de vidrio. Por otra parte, también se evaluó el método de inoculación por sumergido con daño previo en la raíz y sin daño previo en la raíz con el fin de comparar los niveles de infección de ambos métodos. En todos los experimentos se analizaron 3 réplicas biológicas por cada genotipo y se inocularon plántulas con suero fisiológico sin bacterias como control negativo. Después de la inoculación, las plantas se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 28 °C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 hs de oscuridad.

### 3.4 Evaluación de la colonización en plantas inoculadas mediante recuento en placa.

A diferentes tiempos luego de la inoculación (3 y 6 días post inoculación), las plantas fueron removidas del medio, desinfectadas superficialmente por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 1 min y lavadas con agua destilada estéril por 1 min. Posteriormente se cortaron segmentos de 2 cm de tallo y de raíz con bisturí estéril, se secaron con papel estéril en cabina de flujo laminar y el peso fresco fue medido para cada muestra. El tejido vegetal analizado fue macerado en 1 ml de agua destilada esterilizada contenido en eppendorfs de 2 ml mediante morteros de plástico estériles.

Para cuantificar *in planta* el nivel de colonización por recuento en placa se prepararon series de diluciones al décimo y se sembraron en placas con medio Phi con TTC (Kelman, 1954) suplementado con gentamicina en el caso de las plantas inoculadas con la cepa reportera fluorescente. Las placas se incubaron por 48 hs a 28°C y luego se determinó el número de unidades formadoras de colonias por gramo de tallo y de raíz de los genotipos evaluados.

### 3.5 Evaluación de la colonización mediante técnicas de microscopía

Se realizó el seguimiento del proceso de infección mediante la observación de cortes por microscopía de epifluorescencia y confocal.

Mediante el uso del microscopio de epifluorescencia (Nikon, Eclipse 80i) se llevó a cabo un *screening* de las raíces de los genotipos analizados, que permitió detectar aquellos fragmentos de raíz con presencia de la bacteria. Una vez detectados dichos fragmentos, se procedió al montaje de cámaras para la observación de cortes por microscopía confocal. Las raíces fueron cortadas con un bisturí estéril en fragmentos de 2 cm de largo y los tallos fueron cortados transversalmente y longitudinalmente. Los cortes transversales de los tallos se realizaron a mano alzada procurando realizar cortes de menos de 1 mm de espesor. Los cortes longitudinales se realizaron a partir de fragmentos de tallo de 2 cm de largo. Los cortes tanto de raíz como de tallo fueron colocados sobre un cubreobjetos con vaselina sólida rodeando el borde. Inmediatamente después, se añadió sobre los cortes de tejido una solución de agarosa al 1% fundida y termostatzada a 45 °C. Finalmente se colocó un portaobjetos en la parte superior antes de que la agarosa gelificara para sellar la cámara. Las fotografías fueron tomadas con un sistema digital Leica conectado a un microscopio confocal láser de barrido (Leica TCS SP5).

---

---

## 3.6 Seguimiento y cuantificación de *R. solanaceum* mediante qPCR

### 3.6.1 Blanco de detección y condiciones de amplificación

En este trabajo, se utilizó el sistema de primers generales para *R. solanacearum* 759-760 (Tabla 3-2) (Opina et al., 1997) y una sonda de hidrólisis (sonda Taqman) la cual hibrida con una región específica interna al amplicón de 280 pb.

**Tabla 3-2. Secuencia nucleotídica del sistema de primers generales y sonda para *R. solanacearum* 759-760.**

Primers generales/Sonda	Secuencia
Primer 759 forward	GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC
Primer 760 reverse	GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG
Sonda	CGCCCTCAACTCACTTTCCAATTC

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *Rotor Gene 6000* (Qiagen) bajo las siguientes condiciones de amplificación: 15 min de incubación a 95°C, seguida de 40 ciclos de desnaturalización durante 15 seg a 94°C y *annealing*-extensión durante 60 seg a 60°C. La adquisición de fluorescencia se realizó en esta última etapa de cada ciclo. En la tabla 3-3 se indican las condiciones de los reactivos utilizados para llevar a cabo las reacciones.

**Tabla 3-3. Preparación de las mezclas de reacción de qPCR con el sistema de primers generales**

Componentes	Concentración final	Volumen (µl)
Máster mix (QuantiTec, Qiagen)	1x	12,5
Primer 759_F	0,4 µM	1
Primer 760_R	0,4 µM	1
Sonda	0,2 µM	0,5
Agua miliQ	-	8
ADN	-	2
Volumen total	-	25

En todas las reacciones se utilizaron controles positivos (ADN genómico de *R. solanacearum*) y blancos de reacción sin ADN (*NTC, No Template Control*).

---

El análisis de los datos de qPCR se realizó mediante el *Software Rotor-Gene 6000 Series* versión 1.7. Para cada muestra el programa informático calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base. Este ciclo se denomina ciclo umbral de cuantificación ( $C_q$ ) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra (Costa, 2004). Para obtener los valores de  $C_q$  un umbral adecuado fue fijado previamente de forma manual (0,02) en el punto de inflexión de la curva de fluorescencia en función de los ciclos teniendo en cuenta el ruido de fondo y los blancos de reacción. Se tomó como criterio que las muestras positivas son todas aquellas cuyos valores de  $C_q$  son menores a 35 ciclos. En todos los experimentos realizados todas las muestras se analizaron por duplicado (réplicas técnicas).

### 3.6.2 Determinación de la sensibilidad y eficiencia de la reacción

Para evaluar la eficiencia del sistema de *primers* generales para *R. solanacearum* 759-760 y determinar su sensibilidad en las condiciones utilizadas, se construyó una curva de calibración con diluciones seriadas al décimo de una muestra de ADN genómico de *R. solanacearum* (cepa UW551), en un rango de 80 ng a 0,8 pg de ADN por reacción. Estas diluciones se realizaron en agua destilada estéril. La cuantificación del ADN genómico de partida se realizó en un equipo *NanoDrop ND-100* (*Nanodrop Technologies*). A partir de la curva de calibración ( $C_q$  en función del logaritmo de la concentración de ADN) se determinó la linealidad de la misma mediante regresión lineal y se utilizó la pendiente para determinar la eficiencia de la reacción según la ecuación (Dorak, 2006):

$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$$

Cuando se trabaja con diluciones seriadas en base diez, si la eficiencia es de 1 o 100%, la pendiente será de -3,322 indicando que la cantidad de producto de PCR se duplica en cada ciclo. El rango dinámico se define como el rango en el que podemos realizar la cuantificación, es decir los valores comprendidos entre la dilución de mayor concentración y la de menor concentración (Dorak, 2006). También se calculó el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) que es una medida estadística de la bondad del ajuste lineal de los datos. El límite de sensibilidad quedó definido como la dilución de menor concentración que el equipo es capaz de detectar.

### 3.6.3 Extracción de ADN a partir de plantas infectadas.

Durante el desarrollo de este trabajo se evaluaron tres métodos de extracción de ADN a partir de plantas inoculadas con *R. solanacearum*: *TRIsure* (*Bioline*), Doyle y Doyle (1987) y *Charge Switch* (*Invitrogen*).

Para el método *TRIsure* se partió de trozos de tallo (2 cm aproximadamente) molidos con morteros de plástico estériles dentro de eppendorfs de 2 ml con 1,2 ml de *buffer TRIsure*. Luego, el material insoluble fue removido por centrifugación a 8000 rpm por 5 min a 4°C y se transfirió el sobrenadante a eppendorfs nuevos. Para la separación de las fases se incubaron las muestras por 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se agregó 250  $\mu$ l de cloroformo agitando vigorosamente con vórtex por 10-15 seg. Se incubaron las muestras durante 3 min a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min a 4°C. Las muestras quedaron separadas en una fase inferior de color verde (fase orgánica), una interfase y una fase superior transparente (fase acuosa). Con ayuda de una pipeta

---

---

intentando no mezclar las diferentes fases, se retiró la fase acuosa (superior) que contiene el ADN, con cuidado de no retirar la interfase. Se continuó trabajando con la fase orgánica y la interfase que contienen el ADN y las proteínas. Para la precipitación del ADN se agregó 350  $\mu$ l de etanol 100% (frío) y se mezcló por inversión. Seguidamente se incubaron las muestras por 3 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 12000 rpm por 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet que contiene el ADN con 1 ml de citrato de sodio 0,1M en 10% de etanol y se agitó suavemente por 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron nuevamente las muestras a 12000 rpm por 5 min a 4°C y se repitió el paso de lavado con citrato de sodio una vez más. Se realizó un último lavado con 1,5 ml de etanol 75% (guardado a -20°C), se invirtieron los tubos suavemente 5 ó 6 veces, se dejaron a temperatura 1 ó 2 min y luego se centrifugaron a 12000 rpm por 5 min a 4°C. Por último, se retiró el sobrenadante y se dejó secar el pellet completamente, re suspendiéndolo en 30  $\mu$ l de agua *miliQ*. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su uso.

Para la extracción de ADN de plantas por el método Doyle y Doyle (1987) se alicuotó buffer CTAB (1 ml por muestra) en un tubo Falcon de 15 ml y se agregó  $\beta$ -mercapto (2 $\mu$ l/ml de muestra). Seguidamente se trituraron los trozos de tallo con N<sub>2</sub> líquido en mortero estéril hasta la formación de un polvo fino. Se trasvasó el polvo a eppendorfs rápidamente evitando que se descongele y se humedezca el material vegetal. Se agregó 1 ml de buffer CTAB 2% por cada 0,2 g de material triturado. Posteriormente se incubó 1 hora a 65°C mezclando de vez en cuando. Pasado ese tiempo se centrifugaron las muestras a 12000 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante (se intentó recuperar aproximadamente el mismo volumen por eppendorf). Luego se trabajó en campana, donde se extrajeron las muestras con un volumen de CHCl<sub>3</sub>: isoamílico por 1 min mezclando bien las muestras por inversión, las cuales se centrifugaron luego por 5 min a 10000 rpm. Una vez separadas las fases, se sacó la fase acuosa (superior) cuidadosamente con pipeta y se agregaron 2,5  $\mu$ l de ARNasa (10mg/ml). Se incubaron las muestras por 30 min a 37°C y se precipitaron con 2/3 volúmenes de isopropanol durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 1000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante, se lavaron las muestras con EtOH 70% frío y se centrifugaron 10 min a 10000 rpm a 4°C. Una vez secadas las muestras en un termobloque a 50°C por 1 hora, fueron resuspendidas en 50 $\mu$ l de agua *miliQ* e incubadas 30 min a 65°C. Por último se guardaron los tubos a -20°C.

En la extracción de ADN vegetal con el kit *Charge Switch (Invitrogen)* primeramente se colocó en hielo el Buffer de Precipitación y se molieron los trozos de tallos de cada muestra (100 mg aproximadamente) en eppendorfs de 2 ml con N<sub>2</sub> líquido. Se agregó 1 ml de *buffer* de lisis a cada muestra y 2  $\mu$ l de ARNasa A (10mg/ml). Posteriormente se preparó el lisado homogeneizando los tubos unos segundos en vortex. Se agregaron 100  $\mu$ l de SDS por cada ml de lisado y se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 5 min. Se colocaron 400  $\mu$ l de *buffer* de precipitación a cada tubo con el lisado, mezclando por inversión hasta que se formó un precipitado. Luego se centrifugaron las muestras a máxima velocidad por 5 min a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a tubos de 1,5ml. Para la separación del ADN se mezcló en vortex cuidadosamente el tubo conteniendo las *Magnetic beads*. Se agregaron 100  $\mu$ l de detergente 10% por cada 1,2 ml de lisado y 40  $\mu$ l de la suspensión de *Magnetic beads*, mezclando hacia arriba y hacia abajo cuidadosamente con una pipeta de 1 ml evitando la formación de burbujas. Luego se incubaron las muestras por 1 min a temperatura ambiente y se pusieron los tubos en la base MagnaRack (en la posición del imán) hasta que las *beads* formen un pellet. Sin sacar los tubos del imán se aspiró y descartó el sobrenadante de cada tubo cuidadosamente sin afectar al pellet. Se sacaron los tubos de la posición del imán, se agregó 1 ml de *buffer* de lavado y se mezcló cuidadosamente pipeteando hacia arriba y abajo 5 veces usando una pipeta de 1 ml evitando la formación de burbujas. Se pusieron

---

---

los tubos en la posición del imán hasta que se formó el pellet y el sobrenadante fue claro. Sin sacar los tubos del imán se aspiró y descartó el sobrenadante de cada tubo sin afectar al pellet. Se volvió a repetir el lavado de ADN una vez más. Luego de terminada la etapa de lavado, se sacaron los tubos de la posición del imán y se agregaron 100 µl de *buffer* de elución. Se mezcló cuidadosamente con pipeta unas 30 veces hasta que las beads quedaron bien dispersas y se incubaron los tubos a temperatura ambiente 1 min. Se volvieron a colocar los tubos en la posición del imán hasta que las beads formen un pellet y sin sacar los tubos del imán se transfirió el sobrenadante de cada tubo conteniendo el ADN a un tubo nuevo. Finalmente el ADN de cada muestra se guardó a -20°C.

Estos tres métodos de extracción se evaluaron con el propósito de seleccionar el mejor método de extracción a utilizar en ensayos posteriores. Para comparar dichos métodos, se realizaron inoculaciones artificiales con distintas concentraciones de células de *R. solanacearum* en cada de las muestras vegetales utilizadas para la extracción de ADN vegetal. Los inóculos se prepararon a partir de una suspensión de células de *R. solanacearum* en suero fisiológico estéril a partir de un cultivo de 48 hs de la bacteria en medio Phi (Kelman, 1954), Apéndice 1. La suspensión se ajustó espectrofotométricamente a una concentración aproximada de 10<sup>8</sup> ufc/ml (densidad óptica a 600 nm de 0.1). A partir de esta suspensión madre se prepararon diluciones seriadas al décimo en un rango de concentraciones de 10<sup>8</sup> a 10<sup>6</sup> ufc/ml. Estas diluciones se prepararon en suero fisiológico estéril. Las inoculaciones se realizaron por triplicado. Como control negativo se incluyó tejido vegetal sin inocular y como control positivo se utilizó ADN genómico de *R. solanacearum*. La detección de *R. solanacearum* a partir de los ADNs extraídos se llevó a cabo por reacciones de qPCR siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

La calidad y la cantidad del ADN extraído por cada método se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (1%).

### 3.6.4 Evaluación del efecto matriz

Para determinar si existe inhibición de la reacción por parte de la matriz se comparó la sensibilidad y la eficiencia de dos curvas de calibración construidas: una a partir de las diluciones seriadas de ADN de *R. solanacearum* en agua y la otra con las mismas diluciones pero preparadas en matriz, en un rango de 10 ng a 1 pg de ADN por reacción. La cuantificación del ADN genómico de partida se realizó en un equipo *NanoDrop ND-100 (Nanodrop Technologies)*. A partir de la curva de calibración ( $C_q$  en función del logaritmo de la concentración de ADN) se determinó la linealidad de la misma mediante regresión lineal y se utilizó la pendiente para determinar la eficiencia de la reacción según la ecuación (Dorak, 2006):

$$\text{Eficiencia} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1$$

### 3.6.5 Cuantificación de *R. solanacearum* mediante qPCR

El análisis de los datos de qPCR fue realizado mediante el *Software Rotor-Gene 6000 Series* versión 1.7. Se realizó la cuantificación de la cantidad de muestra de ADN presente en la muestra, a partir de la extrapolación con una curva de calibración construida a partir de estándares de concentración conocida ( $C_q$  en función del logaritmo de la concentración de ADN). En este trabajo, se construyó una curva de calibración con diluciones seriadas al décimo de una muestra de ADN genómico de *R. solanacearum* (cepa

---

UY036), en un rango de 10 ng a 0,01 pg de ADN por reacción. Estas diluciones se realizaron utilizando como diluyente ADN extraído a partir de plantas sanas (libres de patógeno) mediante el método Doyle y Doyle (1987) elegido como el mejor de los tres métodos comparados. Cada estándar se analizó por duplicado.

La cuantificación del patógeno *in planta* se realizó para tres de los genotipos utilizados en este estudio: 11.201.27, P79 y el cultivar *Chiteftain* como control susceptible. Las plantas se inocularon por sumergido de las raíces (sin daño) en una suspensión de la cepa reportera UY036 de *R. solanacearum* y fueron transferidas a tubos de vidrio conteniendo 45 ml de medio Murashige-Skoog modificado líquido y perlitas de polipropileno. A los 3 y 6 días post inoculación se removieron del medio y fueron desinfectadas por inmersión con hipoclorito de sodio al 1% por 1 min y lavado con agua destilada estéril por 1 min. Posteriormente se cortaron 2 cm de tallo de cada genotipo analizado con bisturí estéril, se secaron con papel estéril en cabina de flujo laminar y el peso fresco fue medido. Se realizó la extracción de ADN a partir del tejido vegetal infectado utilizando el método de Doyle y Doyle (1987). En paralelo se analizaron plantas de cada genotipo inoculadas con agua como controles negativos. Finalmente se llevó a cabo la reacción de qPCR utilizando el sistema de *primers/sonda* TaqMan 759-760 (Opina et al., 1997) y las condiciones de amplificación detalladas en la Tabla 3-3.

---

## 4-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

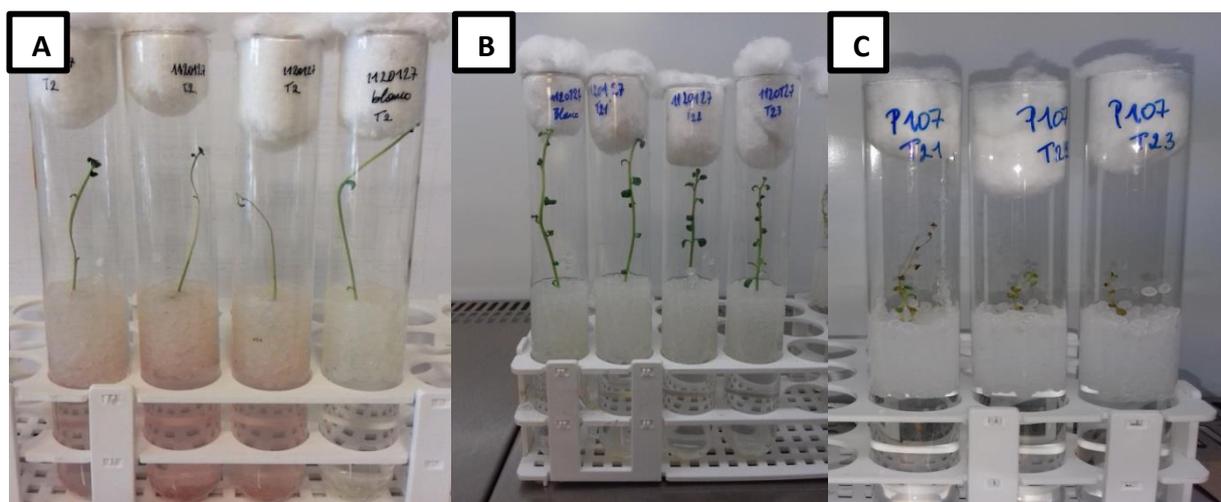
---

## 4.1 Optimización de condiciones para la evaluación de resistencia *in vitro*

Con el fin de optimizar las condiciones para la realización de los ensayos *in vitro* se evaluaron distintas variantes del medio, así como diferentes soportes de las plantas. Como variantes del medio se evaluó el medio Murashige-Skoog líquido modificado sin sacarosa y suplementado con 30 g/l de sacarosa, así como el agregado del antibiótico tetraciclina al medio líquido. Estas variantes se evaluaron con el objetivo de evitar el crecimiento del patógeno en el medio de inmersión de las plantas.

En una primera instancia se realizó una prueba inoculando plantas del genotipo 11.201.27 y P107 y trasvasando las mismas a tubos de vidrio conteniendo medio Murashige-Skoog líquido modificado suplementado con 30 g/l de sacarosa y sin antibiótico. Se observó turbidez en el medio, lo que indica crecimiento de la bacteria en el mismo (Figura 9 A). Esto sugiere que la sacarosa del medio está siendo utilizada por las bacterias como fuente de carbono, por lo que se evaluaron variantes para evitar esto. Las variantes evaluadas fueron: i) medio Murashige-Skoog líquido modificado suplementado con 30 g/l de sacarosa y agregado del antibiótico tetraciclina al medio líquido y ii) medio Murashige-Skoog líquido modificado sin sacarosa y sin el agregado del antibiótico tetraciclina al medio. La evaluación de las diferentes condiciones se realizó mediante recuento del patógeno a nivel del tallo de las plantas a los 3 días post inoculación. Como resultado se observó que el agregado del antibiótico al medio no resulta conveniente ya que el mismo interfiere con la infección de las plantas a nivel de las raíces. Si bien no se observó turbidez del medio, no se visualizaron síntomas de la enfermedad en ninguna de las plantas evaluadas ni se logró recuperar la bacteria a partir del tallo (Figura 9 B). Es probable que esto se deba a que el antibiótico inhibe la multiplicación de las bacterias a nivel de las raíces, lo que interfiere con la colonización y multiplicación del patógeno a nivel del tallo.

Por otro lado, cuando se utilizó el medio Murashige-Skoog líquido modificado sin sacarosa y sin el agregado del antibiótico tetraciclina, se evitó la multiplicación de la bacteria en el medio, se observaron síntomas de marchitamiento en las plantas evaluadas (Figura 9 C) y se verificó la infección del patógeno desde las raíces al tallo, alcanzando niveles de infección en el orden de  $10^8$ - $10^9$  ufc/g.



**Figura 9.** Distintas variantes del medio Murashige-Skoog líquido modificado a los 3 días post inoculación de los genotipos seleccionados. A) medio Murashige-Skoog líquido modificado suplementado con 30 g/l de sacarosa y sin antibiótico. B) medio Murashige-Skoog líquido modificado sin sacarosa y con el agregado del antibiótico y C) medio Murashige-Skoog líquido modificado sin sacarosa y sin el agregado del antibiótico.

También se evaluaron perlitas de distinto material para comparar su eficacia en cuanto a su flotabilidad y a su capacidad de sostén de las plantas en crecimiento. Se observó que las perlitas de polipropileno presentaban una mayor flotabilidad y capacidad de soporte de las plantas en el medio líquido que las perlitas expandidas. Las perlitas expandidas, compuestas por un mineral de origen volcánico formado principalmente por silicatos, no mantenían su flotabilidad lo que impedía un soporte adecuado para las plantas en el medio líquido.

Por otra parte, se evaluaron diferentes variantes para la inoculación de las plantas de papa crecidas en cultivo *in vitro*, con la finalidad de elegir el método más eficiente para la realización de los ensayos.

En primera instancia, se compararon dos métodos de inoculación: i) inoculación directa del patógeno en el medio de cultivo líquido y ii) inoculación por sumergido de raíces en una suspensión del patógeno. La evaluación de ambos métodos se realizó sobre plantas de *S. tuberosum* cv. *Chieftain*. A los 3 días luego de la inoculación se evaluaron las plantas mediante cuantificación por recuento en placa. Los títulos bacterianos difirieron significativamente entre ambos métodos, observándose una diferencia de varios órdenes. Solo algunas de las plantas inoculadas por el método de inoculación directa se infectaron, alcanzando un nivel de  $10^5$  ufc/g. Las plantas inoculadas por sumergido en la suspensión de *R. solanacearum* alcanzaron niveles de infección más elevados, en el orden de  $10^8$ - $10^9$  ufc/g (Tabla 4-1). Por tanto, el método de inoculación por sumergido resultó más eficiente que el método de inoculación directa en el medio de cultivo y fue elegido para los próximos ensayos.

**Tabla 4-1. Cuantificación por recuento en placa del nivel de infección con diferentes métodos de inoculación.**

Método de inoculación	Proporción de plantas infectadas	ufc/g de tejido (promedio)
Inoculación directa en el medio de cultivo	2/5	$4,7 \times 10^5$
Inoculación por sumergido en una suspensión de <i>R. solanacearum</i>	2/2	$1,1 \times 10^9$

En segunda instancia, se comparó el método de inoculación por sumergido con daño previo en la raíz y sin daño previo en la raíz. La evaluación de estas dos variantes se realizó a diferentes tiempos mediante cuantificación por recuento en placa, utilizando plantas de *S. tuberosum* cv. *Chieftain*. Tanto a las 24 hs como a los 4 días se alcanzaron mayores niveles de colonización con el método de inoculación por sumergido con daño previo en la raíz (Tabla 4-2).

El método de inoculación sin corte de raíces resultó ser menos agresivo según los resultados de este ensayo.

**Tabla 4-2. Niveles de infección (ufc/g) obtenidos con los diferentes tratamientos evaluados (sin corte en la raíz y con corte en la raíz) a las 24 hs y a los 4 días post inoculación.**

Tiempo	Tratamiento	Resultado (ufc/g)
24hs	Sin daño en la raíz	$<5,9 \times 10^3$
24hs	Con daño en la raíz	$4,6 \times 10^4$
4 días	Sin daño en la raíz	$8,5 \times 10^6$
4 días	Con daño en la raíz	$3,2 \times 10^8$

Las mismas variantes también se compararon utilizando diferentes genotipos con la finalidad de concluir que método de inoculación permite discriminar entre el control susceptible *Solanum tuberosum* cultivar *Chieftain* y los genotipos tolerantes.

Se evaluaron los niveles de colonización alcanzados inoculando los genotipos *Chieftain*, 09.509.6, 11.201.27 y P121 por sumergido con daño previo en la raíz. Dicha evaluación se realizó a las 24hs post inoculación y a los 3 días post inoculación mediante cuantificación por recuento en placa. No se observaron diferencias significativas en el nivel de colonización entre el control susceptible *Chieftain* y los genotipos evaluados en ninguno de los dos tiempos analizados. Las plantas a las 24 hs alcanzaron un nivel de infección en el orden de  $10^5$ - $10^6$  ufc/g. A los 3 días luego de la inoculación todos los genotipos alcanzaron un nivel de colonización de  $10^9$  ufc/g (Tabla 4-3).

**Tabla 4-3. Valores de recuento a las 24 hs y a los 3 dpi para los genotipos *Chieftain*, 09.509.6, 11.201.27 y P121.**

Genotipo	Proporción plantas infectadas Tiempo 1	ufc/g (promedio) Tiempo 1	Proporción plantas infectadas Tiempo 2	ufc/g (promedio) Tiempo 2
<i>Chieftain</i>	3/3	$4,9 \times 10^5$	3/3	$4,6 \times 10^9$
09.509.6	2/3	$2,2 \times 10^6$	3/3	$3,4 \times 10^9$
11.201.27	2/3	$6,5 \times 10^5$	3/3	$3,4 \times 10^9$
P121	3/3	$9,0 \times 10^5$	3/3	$2,6 \times 10^9$

Posteriormente se cuantificaron por recuento en placa los niveles de infección de los genotipos *Chieftain*, 08.302.4, 06.201.2 y P107. Para ello, dichos genotipos se inocularon por sumergido en una suspensión de la cepa reportera fluorescente (cepa UY031 Pps-GFP) sin daño previo en la raíz y se evaluó la colonización a los 3 y a los 6 dpi. Los valores de recuento obtenidos no difieren significativamente entre los genotipos evaluados (Tabla 4-4).

**Tabla 4-4. Valores de recuento a los 3 dpi y a los 6 dpi para los genotipos *Chieftain*, 08.302.4, 06.201.2 y P107.**

Genotipo	Proporción plantas infectadas Tiempo 1	ufc/g (promedio) Tiempo 1	Proporción plantas infectadas Tiempo 2	ufc/g (promedio) Tiempo 2
<i>Chieftain</i>	3/3	3,8x10 <sup>7</sup>	2/3	4,3x10 <sup>9</sup>
08.302.4	3/3	7,3x10 <sup>6</sup>	3/3	2,4x10 <sup>9</sup>
06.201.2	3/3	2,0x10 <sup>7</sup>	3/3	3,3x10 <sup>9</sup>
P107	2/3	1,7x10 <sup>7</sup>	3/3	2,6x10 <sup>9</sup>

Por otra parte se inocularon los genotipos *Chieftain*, 11.201.27 y P79 sin daño previo en la raíz en una suspensión de la cepa UY036 de *R. solanacearum*. Los valores de recuento de los genotipos dieron similares para ambos tiempos (3 y 6 días post inoculación), no se pudo discriminar entre el genotipo susceptible *Chieftain* y los genotipos tolerantes (Tabla 4-5).

**Tabla 4-5. Niveles de colonización (ufc/g) obtenidos a los 3 dpi y a los 6 dpi para los genotipos *Chieftain*, 11.201.27 y P79.**

Genotipo	Proporción plantas infectadas Tiempo 1	ufc/g (promedio) Tiempo 1	Proporción plantas infectadas Tiempo 2	ufc/g (promedio) Tiempo 2
<i>Chieftain</i>	3/3	2,5x10 <sup>7</sup>	2/3	4,4x10 <sup>8</sup>
11.201.27	3/3	2,3x10 <sup>8</sup>	3/3	8,8x10 <sup>9</sup>
P79	3/3	2,4x10 <sup>7</sup>	1/3	8,2x10 <sup>9</sup>

Como resultado de los ensayos realizados utilizando diferentes genotipos se observaron niveles de colonización mayores cuando se utilizó el método de inoculación por sumergido con daño previo en la raíz. Es probable que esto se deba a la agresividad de este método. En cambio, el método de inoculación por sumergido sin daño previo en la raíz es un método que imita mejor el proceso natural, que ocurre por la penetración de la bacteria en la planta a través de heridas radiculares presentes en los sitios de emergencia de las raíces secundarias o las provocadas por nematodos e insectos (Hayward, 1991). Por otro lado, en ninguno de los ensayos se logró discriminar entre el control susceptible *Solanum tuberosum* cultivar *Chieftain* y los genotipos tolerantes.

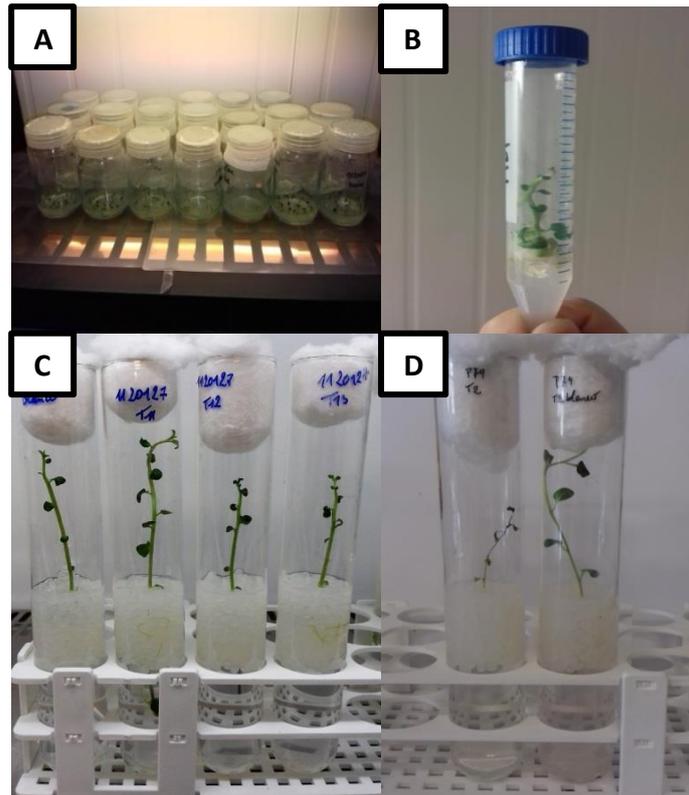
Por último, se evaluó la colonización en los genotipos *Chieftain*, 09.509.6, P80 y 11.201.27 a los 3 dpi y a los 6 dpi con una concentración de inóculo de 10<sup>6</sup> ufc/ml. El nivel de colonización del control susceptible *Chieftain* fue en este ensayo dos órdenes mayor que el nivel alcanzado por el genotipo 11.201.27. Entre los otros tres genotipos y *Chieftain* no se encontraron diferencias. Para el tiempo 2, el cultivar *Chieftain* presentó una diferencia con respecto al genotipo P80 (Tabla 4-6).

Tabla 4-6. Valores de recuento a los 3 dpi y a los 6 dpi para los genotipos *Chieftain*, 09.509.6, P80 y 11.201.27.

Genotipo	Proporción plantas infectadas Tiempo 1	ufc/g (promedio) Tiempo 1	Proporción plantas infectadas Tiempo 2	ufc/g (promedio) Tiempo 2
<i>Chieftain</i>	3/3	$2,8 \times 10^7$	3/3	$4,4 \times 10^8$
09.509.6	3/3	$5,9 \times 10^7$	3/3	$1,1 \times 10^9$
P80	2/3	$2,2 \times 10^8$	0/3	$<3,0 \times 10^7$
11.201.27	1/3	$6,7 \times 10^5$	1/3	$1,0 \times 10^9$

Si bien el método de recuento en placa permitió el seguimiento del patógeno, no permitió discriminar entre genotipos susceptibles y tolerantes. Es probable que los genotipos caracterizados como tolerantes estén presentando una respuesta similar al control susceptible *Chieftain*. Cuando se varió la concentración del inóculo, se logró discriminar entre el genotipo susceptible *Chieftain* y dos de los genotipos evaluados. Esto indica la necesidad de evaluar concentraciones aún menores de inóculo para identificar mayores diferencias en la respuesta de los genotipos frente a la infección.

Por tanto, el sistema elegido consistió en hacer crecer las plantas en el medio Murashige-Skoog modificado y suplementado con 30 g de sacarosa por litro (Murashige y Skoog, 1962), y luego de 15 días inocular por sumergido los genotipos en una suspensión de *R. solanacearum* de  $10^6$  ufc/ml durante 15 min sin daño previo en la raíz. Seguidamente trasvasar las plantas a tubos de vidrio de 30 mm de diámetro y 200 mm de largo conteniendo 45 ml de medio Murashige-Skoog líquido modificado sin sacarosa y sin tetraciclina (Murashige y Skoog, 1962) y perlitas de polipropileno como soporte de las plantas (Figura 10). A diferentes tiempos luego de la inoculación se realizó el seguimiento del patógeno mediante diferentes métodos: evaluación de síntomas, recuento en placa a partir de tejidos infectados, cuantificación por real time PCR y observación de cortes por microscopía confocal utilizando una cepa reportera fluorescente (*R. solanacearum* UY031 Pps-GFP).



**Figura 10.** Resumen de los ensayos experimentales para la evaluación de resistencia a *Ralstonia solanacearum* en germoplasma de papa mediante ensayos *in vitro*. A. Micropropagación de los genotipos de papa a partir de esquejes de un solo nudo. B. Inoculación por sumergido de los genotipos en una suspensión de *R. solanacearum* de  $10^6$  ufc/ml durante 15 min. C. Plantas transferidas a tubos de vidrio conteniendo 45 ml de medio Murashige-Skoog líquido modificado (sin sacarosa y sin tetraciclina) y perlitas de polipropileno como soporte de las plantas. D. Aparición de los síntomas en el genotipo P79 luego de 6 días posteriores a la inoculación. El control negativo (tubo de la derecha) fue inoculado con suero fisiológico.

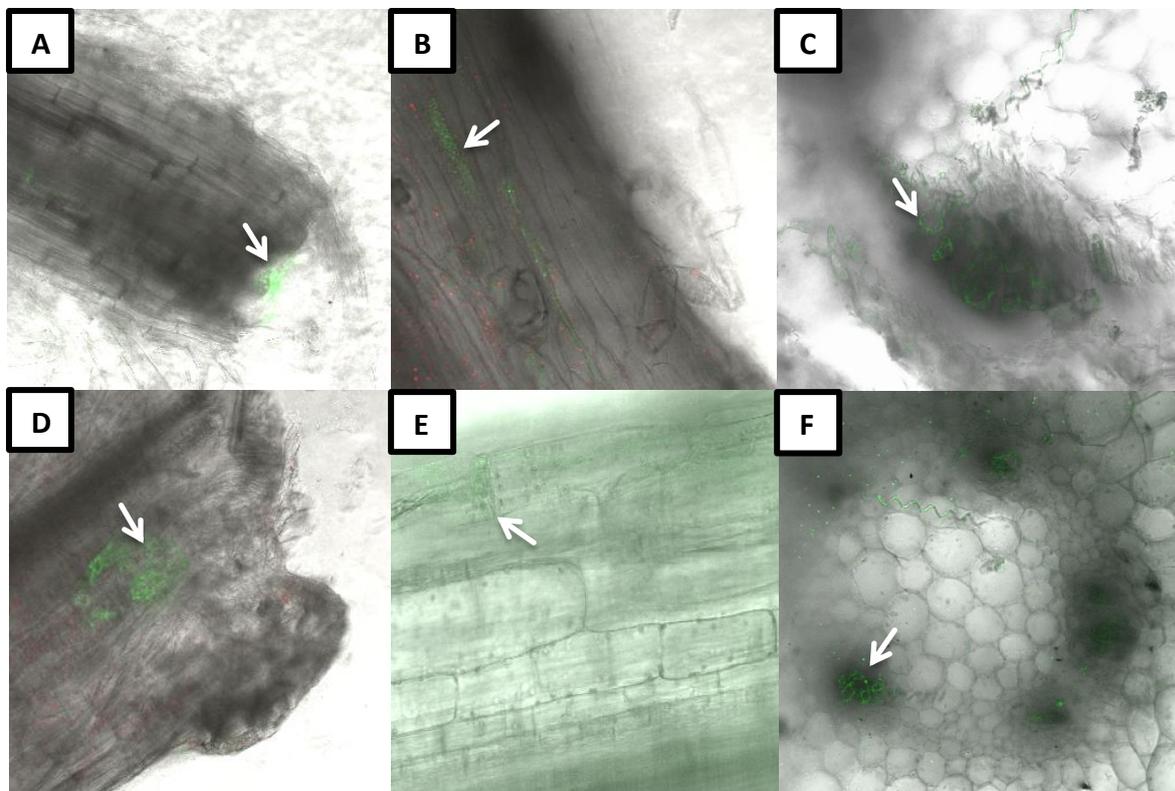
## 4.5 Seguimiento del patógeno mediante técnicas de microscopía

La capacidad de la cepa reportera fluorescente de *R. solanacearum* UY031 Pps-GFP para colonizar plantas de papa durante la infección fue examinada por microscopía de epifluorescencia y confocal. La localización de la cepa fluorescente se examinó de forma preliminar mediante microscopía de epifluorescencia a lo largo de toda la raíz. Una vez localizada la bacteria en la raíz se visualizó dicha zona, así como cortes de tallo, por microscopía confocal.

Estas evaluaciones se realizaron con el objetivo de discriminar entre genotipos a nivel de colonización y distribución del patógeno en raíces y tallo. Entre las ventajas de la observación de cortes por microscopía confocal se encuentra principalmente la detección y monitoreo espacio-temporal del patógeno *in planta*, aportando información complementaria a la cuantificación del patógeno en los tejidos por recuento en placa. Por otro lado, esta técnica presenta limitaciones tales como la baja sensibilidad, la localización del patógeno limitada a una pequeña porción del tejido y la cantidad de tiempo implicado en la preparación de las muestras, así como en la observación de las mismas.

Se realizó el seguimiento del patógeno mediante microscopía confocal a los 3 dpi para los genotipos *Chieftain*, 09.509.6, 11.201.27 y P121. A todos los genotipos se le realizaron heridas a nivel de la raíz

previo a la inoculación. No se detectó la cepa fluorescente en ninguno de los cortes de los genotipos 09.509.6 y 11.201.27. Este resultado cualitativo no se correlaciona con los niveles de colonización obtenidos, los cuales fueron de  $10^9$  ufc/g para ambos genotipos. Se observó la presencia de *R. solanacearum* tanto en raíz como en los distintos cortes de tallo en el cultivar *Chieftain* y en el genotipo P121. Los cortes de raíz de ambos genotipos mostraron similitud en el nivel de colonización, se observó bacteria localizada en el extremo (Figura 11 A y D). A nivel del tallo, se observaron diferencias en el nivel de colonización en el corte transversal de tallo entre el cultivar susceptible *Chieftain* y el genotipo P121 observándose mayor cantidad de bacteria en el cultivar *Chieftain* (Figura 11 C y F). Este resultado no se correlaciona con los valores obtenidos por recuento en placa, en el orden de  $10^9$  ufc/g para ambos genotipos. Por su parte, en ambos cortes longitudinales se observó la cepa fluorescente en acúmulos localizados en algunos haces vasculares mostrando similitud en el nivel de infección (Figura 11 B y E), lo que indica una correlación entre los valores de recuento y el resultado cualitativo obtenido mediante microscopía confocal.

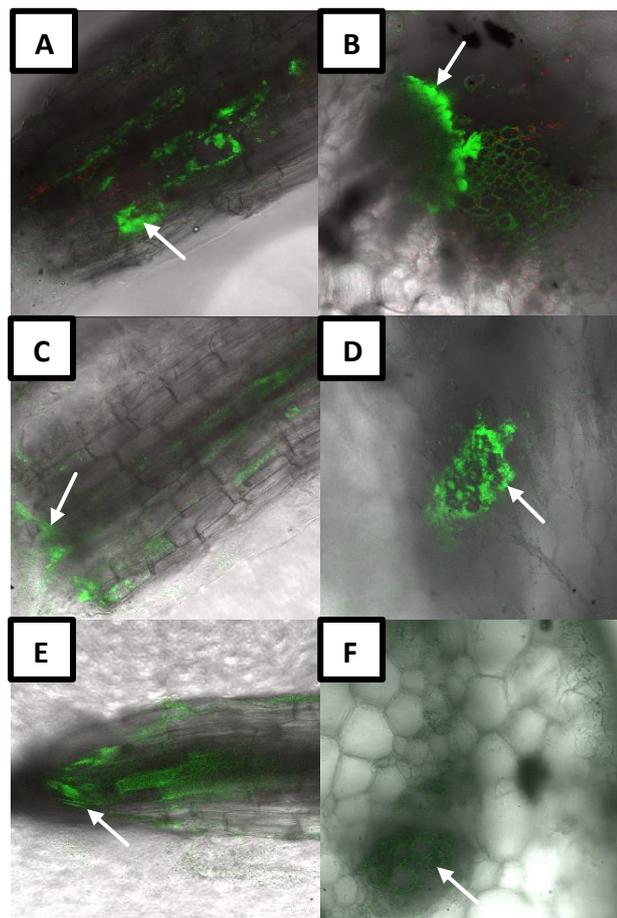


**Figura 11.** Colonización del cultivar susceptible *Chieftain* y del genotipo P121 por la cepa reportera fluorescente de *R. solanacearum* UY031 Pps-GFP. La localización de la cepa fluorescente se examinó mediante microscopía confocal a los 3 días post inoculación. A) Corte de raíz del cultivar *Chieftain* con un aumento de 20x. B) Corte longitudinal de tallo del cultivar *Chieftain* con un aumento de 20x. C) Corte transversal de tallo del cultivar *Chieftain* con un aumento de 20x. D) Corte de raíz del genotipo P121 con un aumento de 20x. E) Corte longitudinal de tallo del genotipo P121 con un aumento de 20x. F) Corte transversal de tallo del genotipo P121 con un aumento de 20x. Las flechas indican la localización de la cepa fluorescente de *R. solanacearum* en los distintos cortes.

En un ensayo posterior se realizó el seguimiento del proceso de infección en otros genotipos (*Chieftain*, 08.302.4, 06.201.2 y P107) y se realizaron evaluaciones por microscopía confocal a los 3 dpi y a los 6 dpi. A los 3 dpi se visualizó la cepa reportera fluorescente de *R. solanacearum* en el corte de raíz del cultivar *Chieftain* y de los genotipos 06.201.2 y 08.302.4 (Figura 12 A, C y E). Las imágenes de dichos cortes

---

mostraron la presencia de la bacteria en pequeños agregados localizados en el extremo de la raíz. En el corte de raíz del genotipo P107 no se observó la bacteria. A nivel del tallo se observó la cepa fluorescente en el corte transversal de tallo del cultivar *Chieftain*, en el genotipo susceptible 06.201.2 y en el genotipo 08.302.4. Todos los cortes presentaron agregados de células en los haces vasculares, observándose un nivel de colonización mayor en *Chieftain* (Figura 12 B, D y F). La diferencia observada en el nivel de infección entre estos genotipos no coincide con los valores obtenidos por recuento en placa, en el orden de  $10^6$ - $10^7$  ufc/g para todos los genotipos. En ninguno de los cortes longitudinales de los genotipos evaluados se observó la cepa fluorescente, sin embargo en la cuantificación del patógeno a nivel del tallo por recuento en placa se obtuvieron valores en el orden de  $10^6$ - $10^7$  ufc/g.

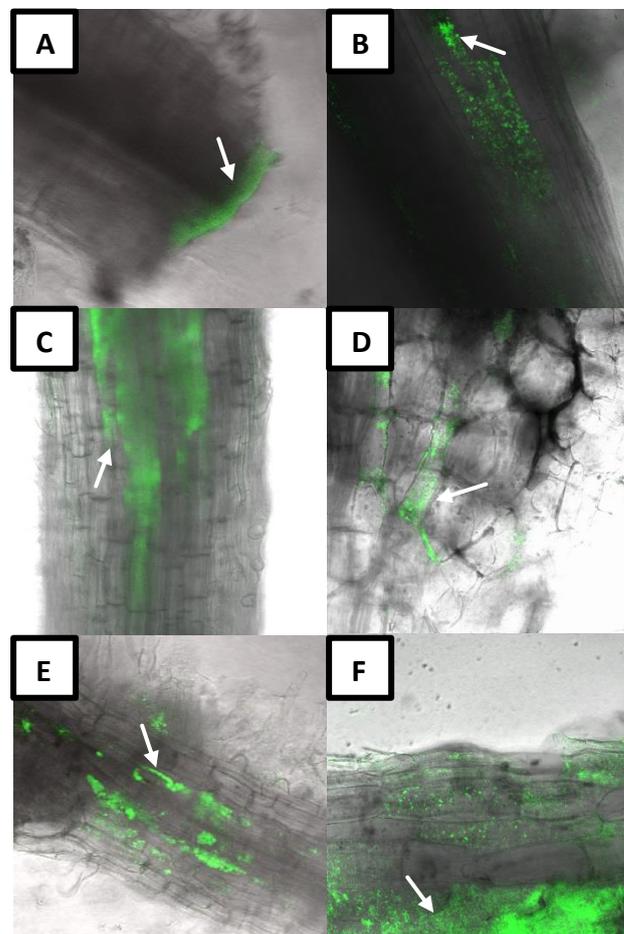


**Figura 12.** Colonización del cultivar susceptible *Chieftain* y de los genotipos 06.201.2 y 08.302.4 por la cepa reportera fluorescente de *R. solanacearum* UY031 Pps-GFP. La localización de la cepa fluorescente se examinó mediante microscopía confocal a los 3 días post inoculación. A) Corte de raíz del cultivar *Chieftain* con un aumento de 20x. B) Corte transversal de tallo del cultivar *Chieftain* con un aumento de 20x. C) Corte de raíz del genotipo 06.201.2 con un aumento de 20x. D) Corte transversal de tallo del genotipo 06.201.2 con un aumento de 20x. E) Corte de raíz del genotipo 08.302.4 con un aumento de 20x. F) Corte transversal de tallo del genotipo 08.302.4 con un aumento de 20x. Las flechas indican la localización de la cepa fluorescente de *R. solanacearum* en los distintos cortes.

A los 6 dpi se visualizó la cepa reportera fluorescente de *R. solanacearum* en el corte de raíz del cultivar *Chieftain* y de los genotipos P107 y 06.201.2 (Figura 13 A, C y E). En la imagen de corte de raíz del cultivar

---

*Chieftain* (Figura 13 A), se observó *R. solanacearum* solo en el extremo en baja cantidad, mientras que los genotipos P107 y 06.201.2 mostraron una mayor densidad de bacterias distribuida a lo largo de toda la raíz (Figura 13 C y E). En el tallo se observó la cepa fluorescente en el corte longitudinal de tallo del cultivar *Chieftain* y en los genotipos P107 y 06.201.2 (Figura 13 B, D y F). Se observó colonización en varios de los haces vasculares de los genotipos susceptibles *Chieftain* y 06.201.2 (Figura 13 B y F) mientras que en el genotipo tolerante P107 se observaron agregados de bacteria localizados en algunos haces vasculares (Figura 13 D). Estos resultados aportan información complementaria a la cuantificación del patógeno en los tejidos por recuento en placa correlacionándose con los mismos. Sin embargo, no se pudo correlacionar dichos valores de recuento con lo observado en los cortes transversales debido a que en los mismos no se visualizó la bacteria. Tampoco se visualizó el patógeno en ninguno de los cortes del genotipo 08.302.4 a pesar de haberse obtenido un nivel de colonización de  $10^9$  ufc/g mediante la evaluación por recuento en placa.

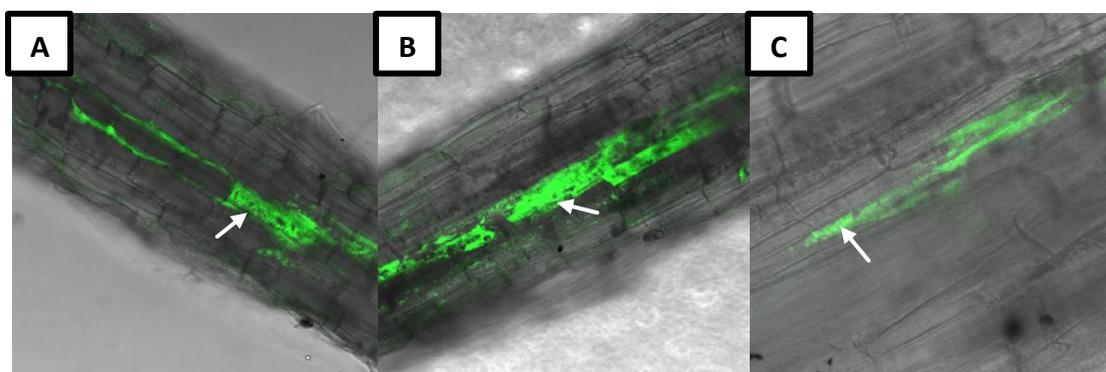


**Figura 13.** Seguimiento del proceso de infección mediante la observación de cortes por microscopía de confocal. Se examinó la colonización de la cepa reportera fluorescente de *R.solanacearum* UY031 Pps-GFP en el cultivar *Chieftain* y en los genotipos P107 y 06.201.2 a los 6 dpi. A) Corte de raíz del cultivar *Chieftain* con un aumento de 20x. B) Corte longitudinal del cultivar *Chieftain* con un aumento de 20x. C) Corte de raíz del genotipo P107 con un aumento de 20x. D) Corte longitudinal de tallo del genotipo P107 con un aumento de 20x. E) Corte de raíz del genotipo 06.201.2 con un aumento de 20x. F) Corte longitudinal de tallo del genotipo 06.201.2 con un aumento de 20x. Las flechas indican la localización de la cepa fluorescente de *R. solanacearum* en los distintos cortes.

---

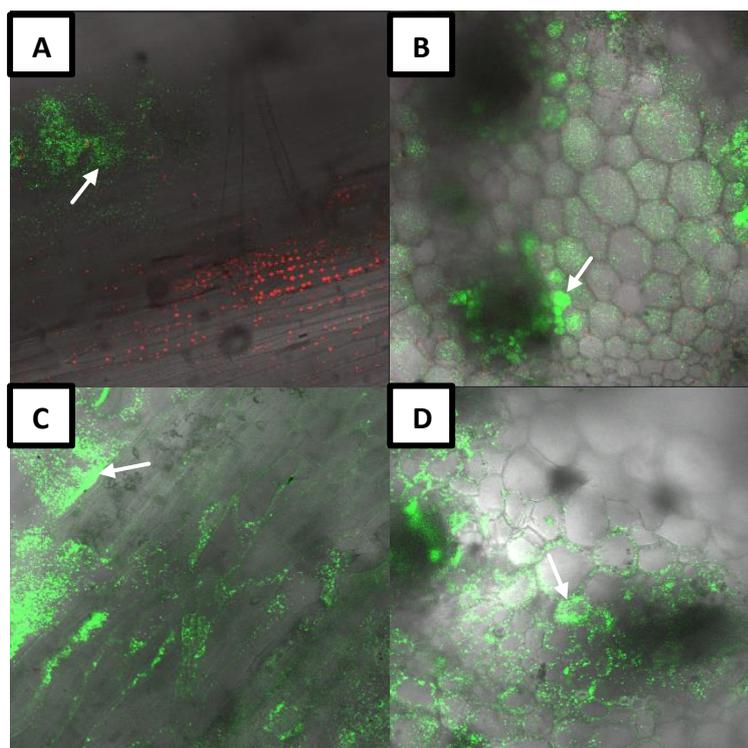
Por otra parte, se realizó el seguimiento del patógeno mediante microscopía confocal a los 3 dpi y a los 6 dpi de los genotipos *Chieftain*, 09.509.6, P80 y 11.201.27 variando la concentración del inóculo a  $10^6$  ufc/ml. Esta modificación se hizo para disminuir la presión de inóculo en los ensayos y evaluar si es posible observar diferencias de colonización entre los genotipos seleccionados.

A los 3 dpi no se detectó la cepa fluorescente en ninguno de los cortes del genotipo 11.201.27. Este resultado cualitativo no se correlaciona con el valor de recuento alcanzado por este genotipo, en el orden de  $10^9$  ufc/g. Se observó la presencia de *R. solanacearum* solamente en el corte de raíz del cultivar *Chieftain* y del genotipo P80. Los cortes de raíz de ambos genotipos mostraron similitud en el nivel de colonización (Figura 14 A, B y C). A nivel del tallo, no se logró visualizar la cepa fluorescente en ninguno de los genotipos evaluados. Sin embargo, en la cuantificación del patógeno a nivel del tallo por recuento en placa se obtuvieron valores en el orden de  $10^7$ - $10^9$  ufc/g para los genotipos evaluados.



**Figura 14.** Seguimiento del proceso de infección mediante la observación de cortes por microscopía de confocal. Se examinó la colonización de la cepa reportera fluorescente de *R. solanacearum* UY031 Pps-GFP en el cultivar *Chieftain* y en los genotipos P80 a los 3 dpi. A) Corte de raíz del cultivar *Chieftain* con un aumento de 20x. B) Corte de raíz del genotipo P80 con un aumento de 20x. C) Corte de raíz del genotipo P80 con un aumento de 63x.

A los 6 dpi no se observó la cepa fluorescente en el corte de raíz del cultivar *Chieftain* y en los genotipos 09.509.6 y 11.201.27; únicamente se observó el patógeno en el corte de raíz del genotipo P80. En los cortes longitudinales de tallo se observó bacteria en *Chieftain* y en el genotipo 09.509.6 (Figura 15 A y C). Se observó un alta densidad bacteriana en el genotipo 09.509.6 distribuida en todo el tallo, mientras que en el cultivar *Chieftain* solo se observó en algunos haces en gran cantidad. Por otra parte, las imágenes de corte transversal mostraron la presencia de *R. solanacearum* en los haces vasculares del cultivar *Chieftain* y en el genotipo 09.509.6 en alta densidad (Figura 15 B y D). Estos resultados se correlacionan con los altos niveles de colonización obtenidos para ambos genotipos. Sin embargo, en el genotipo 11.201.27 no se observó la presencia de bacteria difiriendo con el resultado obtenido por cuantificación por recuento en placa, en el orden de  $10^9$  ufc/ml.



**Figura 15.** Seguimiento del proceso de infección mediante la observación de cortes por microscopía de confocal. Se examinó la colonización de la cepa reportera fluorescente de *R. solanacearum* UY031 Pps-GFP en el cultivar *Chieftain* y en el genotipo 09.509.6 a los 6 dpi. A) Corte longitudinal de tallo del cultivar *Chieftain* con un aumento de 20x. B) Corte transversal de tallo del cultivar *Chieftain* con un aumento de 20x. C) Corte longitudinal de tallo del genotipo 09.509.6 con un aumento de 20x. D) Corte transversal de tallo del genotipo 09.509.6 con un aumento de 20x.

Actualmente no existe ningún reporte sobre el uso del sistema reportero GFP para el monitoreo del proceso de infección de *R. solanacearum* en papa. Por lo tanto, la aplicación de esta tecnología para el monitoreo del patógeno sobre el material resultante de programas de mejoramiento de papa, aporta una alternativa rápida e innovadora para el *screening* de resistencia a *R. solanacearum*. Entre las limitaciones que presenta esta técnica se encuentra la baja sensibilidad, la detección y el seguimiento del patógeno limitado a una pequeña porción del tejido y la cantidad de tiempo implicado en llevar a cabo dicho método.

El objetivo de estas evaluaciones se cumplió de forma parcial, ya que se logró discriminar entre genotipos a nivel de colonización sólo en algunos de los ensayos. Concretamente, se observaron diferencias entre el cultivar susceptible *Chieftain* y los genotipos P121, 06.201.2 y 08.302.4. Sin embargo, dichas diferencias no se obtuvieron mediante cuantificación por recuento en placa.

Por otra parte, en los cortes de algunos genotipos no se observó la cepa fluorescente a pesar de haberse alcanzado altos niveles de colonización por recuento en placa. Es posible que eso se deba a diferencias en la localización del patógeno a lo largo del tallo, situándose la bacteria mayormente en la porción evaluada por recuento en placa y escasamente en la porción utilizada para la realización de los cortes observados por microscopía confocal.

Se han reportado algunos trabajos que refieren al uso de esta tecnología como herramienta para el estudio de la patogénesis de *R. solanacearum* (Aldon et al., 2000; Fujie et al., 2010; Kawasaki et al., 2007;

---

Li et al., 2017; Yao y Allen, 2006). Se han ensayado diferentes estrategias para la introducción del marcador fluorescente en *R. solanacearum*, incluyendo la transformación con varios tipos de plásmidos y la integración genómica al azar por mini transposones. En 2007, Kawasaki *et al.* desarrollaron un vector GFP a partir de la modificación de un fago filamentosos que infecta específicamente a *R. solanacearum*, el cual se mantiene en forma estable por más de 100 generaciones sin selección por antibióticos (Kawasaki et al., 2007). Este vector se utilizó para la generación de un sistema reportero aplicable al monitoreo espacio-temporal del patógeno en el tejido de la planta, contribuyendo al estudio del proceso de infección (Fujie et al., 2009).

En un trabajo reciente, se reportó el uso de plantas de tomate crecidas en cultivo *in vitro* para estudiar los mecanismos de interacción planta-patógeno. El uso de una cepa reportera fluorescente permitió el monitoreo de las infecciones por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis in planta* mediante microscopía confocal. Los resultados de los ensayos indican que estas plantas podrían utilizarse de forma eficiente para realizar ensayos de patogenicidad y como una herramienta de selección en los programas de mejoramiento genético (Lelis et al., 2014).

En este trabajo se utilizó por primera vez el sistema reportero GFP para el monitoreo del proceso de infección de *R. solanacearum* en papa. La aplicación de esta tecnología para el monitoreo del patógeno en plantas de papa crecidas mediante cultivo *in vitro*, aporta una alternativa rápida e innovadora para el *screening* de resistencia a *R. solanacearum*.

## 4.6 Seguimiento y cuantificación de *R. solanacearum* mediante qPCR

El objetivo de poner a punto esta metodología es lograr la cuantificación del patógeno por un método sensible, rápido e independiente de la purificación y aislamiento del patógeno (Denny, 2006; Schaad et al., 2001). La técnica de PCR en tiempo real presenta varias ventajas frente a la PCR convencional. Esta tecnología conjuga las ventajas del uso de la *Taq* polimerasa con la detección mediante fluorescencia del producto específico, sin necesidad de realizar ninguna manipulación adicional posterior a la amplificación. Esta particularidad reduce notablemente los tiempos de análisis permitiendo estandarizar el ensayo para el análisis de un gran número de muestras. Otras ventajas frente a la PCR clásica son su mayor sensibilidad y la disminución de ocurrencia de falsos positivos. Finalmente, un aspecto fundamental que aporta el uso de esta tecnología es la posibilidad de efectuar la cuantificación del ADN diana, lo cual resulta muy difícil de lograr mediante una amplificación clásica (Schaad et al., 1999). La PCR en tiempo real se está convirtiendo en “gold standard” en el diagnóstico de fitopatógenos. Actualmente, debido a su gran especificidad y sensibilidad, la qPCR ha sido incorporada en los protocolos de diagnóstico de enfermedades de plantas, como *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* y *Ralstonia solanacearum* en tubérculos de papa (Schaad et al., 1999; Weller et al., 2000), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* en semillas de arroz (Liao et al., 2003) y *Xylella fastidiosa* en uvas (Schaad et al., 2002).

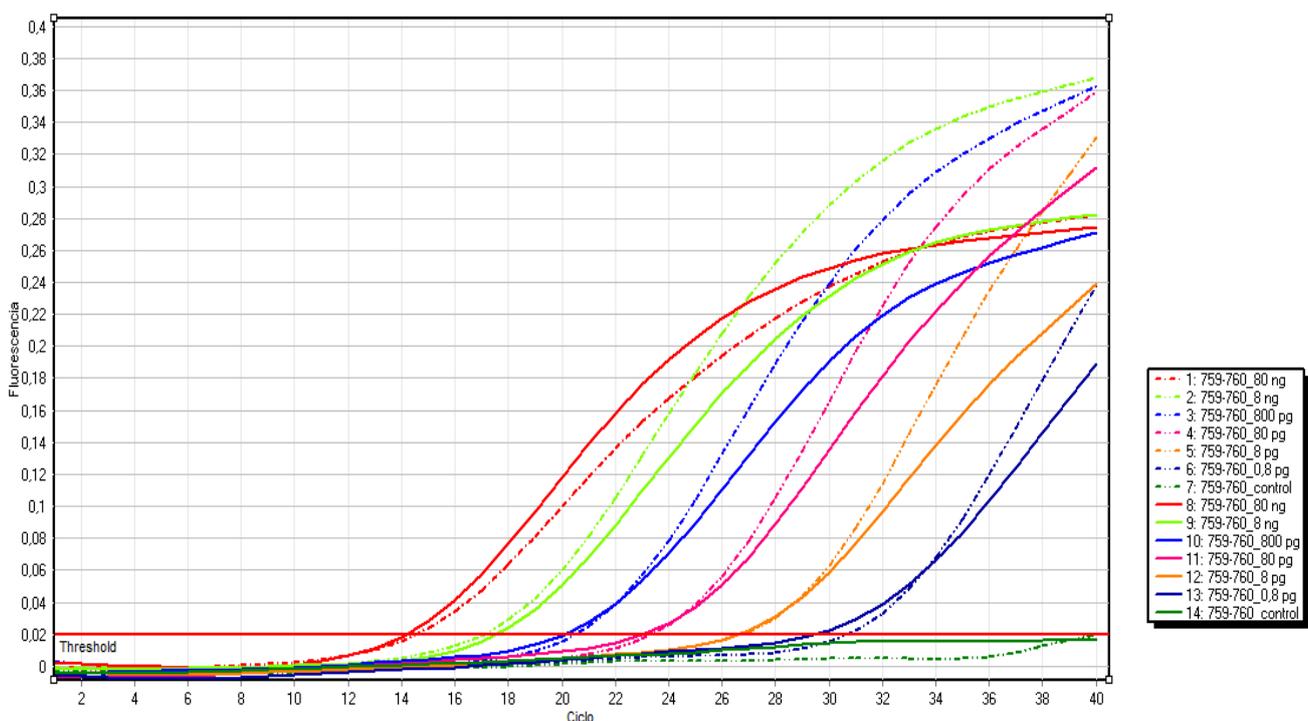
Existen varias estrategias utilizadas para la generación de fluorescencia en reacciones de qPCR. Las más conocidas son el uso de agentes intercalantes (*SYBR green I*) y las sondas de hidrólisis (*Taqman*). Algunas de las ventajas de las sondas *Taqman* frente al uso de intercalantes no específicos como *SYBR green I* son que la hibridación de la sonda al ADN molde le confiere una mayor especificidad a la reacción, y presenta la posibilidad de realizar reacciones de multiplex-PCR con sondas marcadas con diferentes fluoróforos (Valasek y Repa, 2005). Los métodos no específicos se basan en el uso de moléculas intercalantes que

tienen afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal fluorescente. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la PCR. La principal desventaja del uso de agentes intercalantes es que puede unirse a cualquier molécula de ADN de doble cadena, incluyendo dímeros de *primers*. Por este motivo, se deben optimizar las reacciones realizando una “curva melting” o “curva de disociación” al final de la reacción, con el fin de evaluar si se formó un producto único o si hay presencia de dímeros de *primers*. Hoy en día la mayoría de los softwares de los termocicladores ofrecen esta función que es fácil de aplicar y analizar (Tamay de Dios et al., 2013).

En este trabajo, se utilizó el sistema de *primers* generales para *R. solanacearum* 759-760 (Tabla 3-2) (Opina et al., 1997) y una sonda de hidrólisis (sonda Taqman) la cual hibridó con una región específica de un fragmento de 280 pb común a todas las cepas de *R. solanacearum*. Este sistema de *primers*, ampliamente utilizado, apunta a detectar a todas las cepas dentro del complejo de especies de *R. solanacearum*, lo que introduce el riesgo de falsos positivos o falsos negativos de detección por la baja especificidad de las reacciones debido a la gran diversidad que presenta este patógeno (Arahal et al., 2004).

#### 4.6.1 Determinación de la sensibilidad y eficiencia de la reacción

Se determinó la sensibilidad y eficiencia del sistema de *primers* generales para *R. solanacearum* 759-760 mediante la construcción de una curva de calibración a partir de diluciones seriadas al décimo de ADN genómico de *R. solanacearum*, en un rango de 80 ng a 0,8 pg de ADN por reacción. La sensibilidad de detección fue de 0,8 pg de ADN que corresponde a la cantidad de ADN presente en el estándar más diluido que produjo una fluorescencia superior al umbral, con un valor de Cq promedio de 30,16 (Figura 16). En la tabla 4-7 se muestran los valores de Cq para cada dilución.

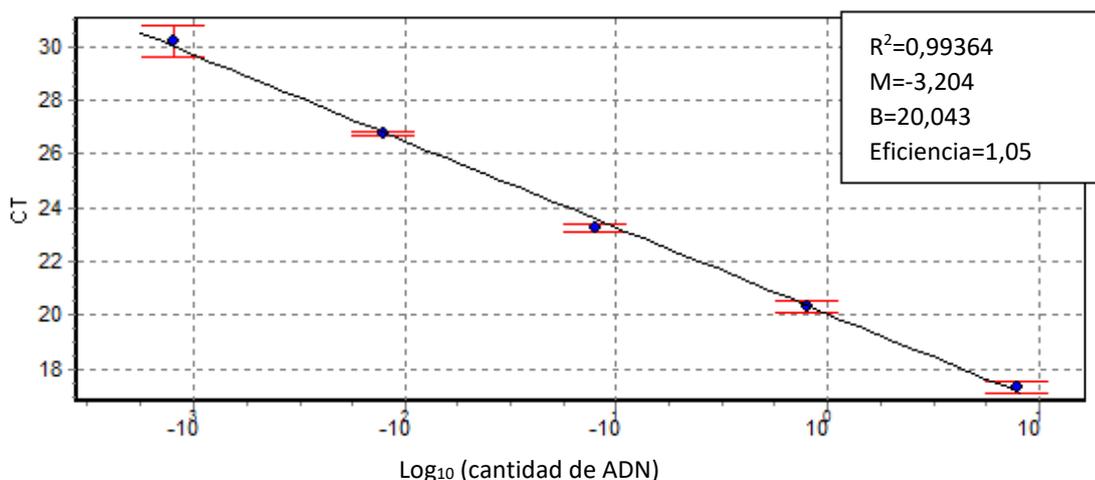


**Figura 16.** Gráfico de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación de diluciones seriadas al décimo de ADN genómico de *R. solanacearum* con el sistema de *primers* generales para *R. solanacearum* 759-760. En el margen derecho se indica el color correspondiente a la cantidad de ADN en cada reacción y el control sin ADN. El umbral fue fijado en 0,02.

**Tabla 4-7. Valores de detección de *R. solanacearum* por qPCR (Cq promedio) para cada dilución seriada de ADN genómico de *R. solanacearum*, en un rango de 80 ng a 0,8 pg de ADN por reacción.**

Cantidad de ADN en cada reacción	Valor de Cq (promedio)
80 ng	14,38
8 ng	17,35
800 pg	20,31
80 pg	23,24
8 pg	26,72
0,8 pg	30,16

La eficiencia de amplificación obtenida a partir del valor de la pendiente de la curva de calibración fue del 105% (Figura 17), siendo el rango lineal de 8,0 pg a 80 ng de ADN. El coeficiente de regresión lineal ( $r^2$ ) fue de 0,99364, lo que demuestra un muy buen ajuste lineal.



**Figura 17.** Curva de calibración de la reacción de qPCR con el sistema de *primers* generales para *R. solanacearum* 759-760. Cada punto azul representa el valor de Cq promedio y su desviación estándar (barras rojas). En el margen superior derecho se indican los parámetros de la curva.

#### 4.6.2 Extracción de ADN

Para seleccionar el mejor método de extracción, se realizaron inoculaciones artificiales con distintas concentraciones de células de *R. solanacearum* (rango de concentraciones de  $10^8$  a  $10^6$  ufc/ml) en cada de las muestras vegetales utilizadas para la extracción de ADN vegetal. Luego, se llevó a cabo la extracción

de ADN por los tres métodos: *TRIsure* (Bioline), Doyle y Doyle (1987) y *Charge Switch* (Invitrogen) y por último se realizó la detección de *R. solanacearum* a partir de los ADNs extraídos por reacciones de qPCR. Los resultados de la reacción de qPCR mostraron una buena reproducibilidad de los tres métodos de extracción de ADN; se obtuvieron valores de  $C_t$  muy parecidos entre réplicas. La comparación de los resultados obtenidos por qPCR permitió seleccionar el método Doyle y Doyle para ensayos posteriores. Todas las muestras analizadas (inoculadas con distintas concentraciones de *R. solanacearum*) presentaron valores de  $C_q$  más bajos por este método en cada una de las diluciones, con respecto a los otros métodos (Tabla 4-8), lo que indica que se logró superar el umbral de fluorescencia en un menor número de ciclos de amplificación obteniéndose por tanto una mayor cantidad de producto. La calidad y la cantidad del ADN extraído con cada método, se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1%) obteniéndose una mayor cantidad y calidad de ADN mediante el método Doyle y Doyle.

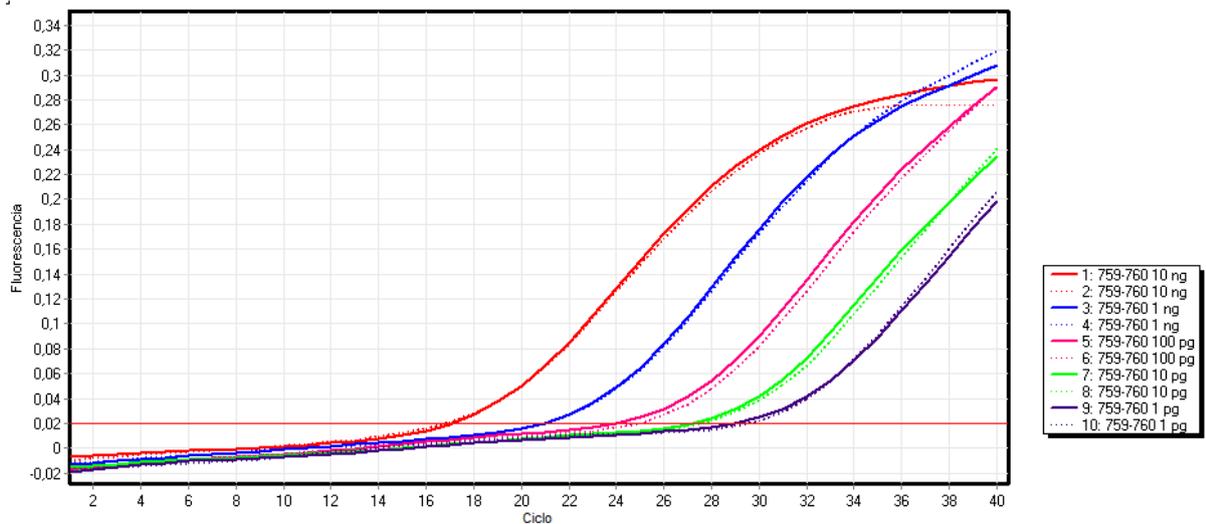
**Tabla 4-8. Valores de detección de *R. solanacearum* por qPCR ( $C_q$  promedio) en muestras vegetales inoculadas artificialmente con distintas concentraciones de *R. solanacearum* (rango de concentraciones de  $10^8$  a  $10^6$  ufc/ml).**

Métodos de extracción / concentración inóculo	Valor $C_q$ (promedio)
Doyle y Doyle / $10^8$ ufc/ml	20,8
Doyle y Doyle/ $10^7$ ufc/ml	24,1
Doyle y Doyle/ $10^6$ ufc/ml	27,1
<i>Charge Switch</i> / $10^8$ ufc/ml	22,2
<i>Charge Switch</i> / $10^7$ ufc/ml	25,2
<i>Charge Switch</i> / $10^6$ ufc/ml	28,7
<i>TRIsure</i> / $10^8$ ufc/ml	26,5
<i>TRIsure</i> / $10^7$ ufc/ml	31,4
<i>TRIsure</i> / $10^6$ ufc/ml	35,6

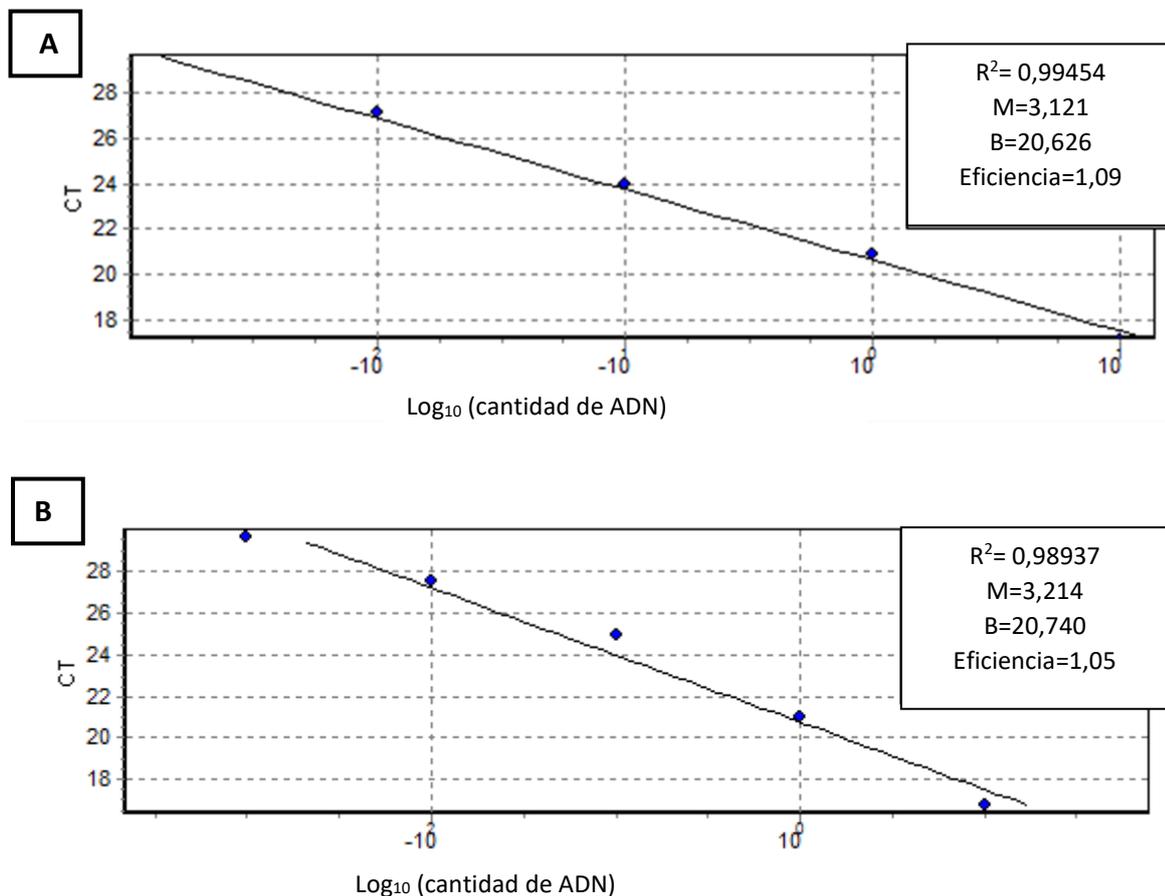
#### 4.6.3 Evaluación del efecto matriz en las reacciones de qPCR

Para determinar si existe inhibición de la reacción por parte de la matriz se comparó la sensibilidad y la eficiencia de las dos curvas de calibración construidas: una a partir de las diluciones seriadas de ADN de *R. solanacearum* en agua y la otra con las mismas diluciones pero preparadas en matriz. La sensibilidad de detección para ambas curvas fue de 1 pg de ADN (Figura 18) y la eficiencia fue del 109% y 105% respectivamente (Figura 19 A y B).

Estos similares resultados indican que no existe inhibición de la reacción por parte de la matriz.



**Figura 18.** Gráfico de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación de diluciones seriadas al décimo de ADN genómico de *R. solanacearum* en agua (línea punteada) y preparadas en matriz (línea continua). Se muestra el resultado promedio de duplicados (Replicate View). En el margen derecho se indica el color correspondiente a la cantidad de ADN en cada reacción. El umbral fue fijado en 0,02.



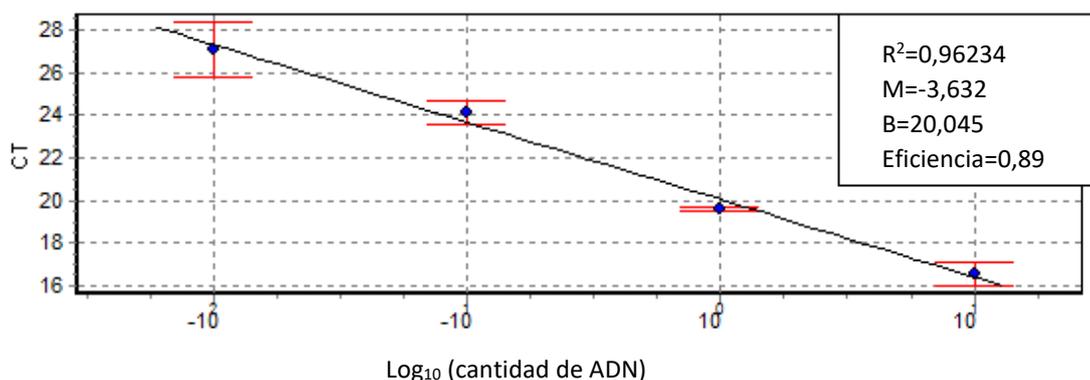
**Figura 19.** Curvas de calibración de las reacciones de qPCR construidas a partir de las diluciones seriadas de ADN de *R. solanacearum* en agua (A) y en matriz (B) con el sistema de *primers* generales para *R. solanacearum* 759-760. Cada punto azul representa el valor de C<sub>q</sub> promedio. En el margen superior derecho se indican los parámetros de la curva.

#### 4.6.4 Cuantificación de *R. solanacearum* mediante qPCR

La cuantificación se realizó para tres de los genotipos utilizados en este estudio: 11.201.27, P79 y el cultivar *Chieftain* como control susceptible a los 6 dpi. Para ello, se realizó el método de extracción Doyle y Doyle para cada una de las muestras incluyendo como control negativo tejido vegetal sin inocular y se llevó a cabo la reacción de qPCR utilizando el sistema de *primers* generales para *R. solanacearum* 759-760 (Opina et al., 1997) y las condiciones de los reactivos detalladas en la Tabla 3-3. Se construyó una curva de calibración con diluciones seriadas al décimo de una muestra de ADN genómico de *R. solanacearum* (cepa UY036 de *R. solanacearum*), en un rango de 10 ng a 0,01 pg de ADN por reacción. Estas diluciones se realizaron en matriz obtenida mediante la extracción de ADN de plantas mediante el método Doyle y Doyle. La comparación entre los  $C_q$  calculados para cada tubo de reacción y los  $C_q$  de muestras de ADN genómico de *R. solanacearum* de concentraciones conocidas permitió la cuantificación de la cantidad de ADN presente en un tubo dado, por medio de la extrapolación en la curva de calibración (Figura 20).

Los valores de concentración de ADN obtenidos por real time PCR, permitieron discriminar entre el cultivar *Chieftain* y los genotipos tolerantes P79 y 11.201.27 (Tabla 4-9). Sin embargo, no se correlacionan estos resultados con los obtenidos mediante cuantificación por recuento en placa, donde se obtuvo un nivel de colonización en el orden de  $10^8$ - $10^9$  ufc/ml para todos los genotipos. Estos resultados pueden deberse a una mala extracción de ADN mediante el método Doyle y Doyle, impidiendo la recuperación de una mayor concentración de ADN de *Ralstonia solanacearum* a partir de las plantas infectadas de los genotipos P79 y 11.201.27. Otra posible explicación es la inhibición parcial o completa de la reacción de qPCR por la presencia de sustancias inhibitoras en las muestras vegetales utilizadas.

Para dilucidar con certeza estos resultados se deberían repetir los ensayos e incluir otros genotipos.



**Figura 20.** Curva de calibración de la reacción de qPCR con el sistema de *primers* generales para *R. solanacearum* 759-760. Cada punto azul representa el valor de  $C_t$  promedio y su desviación estándar (barras rojas). En el margen superior derecho se indican los parámetros de eficiencia.

**Tabla 4-9. Cuantificación de *R. solanacearum* (ng/μl y células/g) mediante qPCR de los genotipos 11.201.27, P79 y *Chieftain* a los 6 dpi.**

Genotipo	Proporción de plantas infectadas	Concentración ADN <i>R. solanacearum</i> (ng/μl) (promedio)	Concentración ADN <i>R. solanacearum</i> (células/g) (promedio)
<i>Chieftain</i>	3/3	1,77	3,0x10 <sup>8</sup>
P79	3/3	0,42	5,6x10 <sup>7</sup>
11.201.27	2/3	0,00913	1,2x10 <sup>6</sup>

La técnica de PCR a tiempo real (qPCR) fue seleccionada con el fin de cuantificar el patógeno en plantas de papa crecidas en cultivo *in vitro*. Debido a sus indudables ventajas, como la mayor eficiencia, sensibilidad, rapidez y el menor riesgo de contaminación cruzada, la qPCR ha adquirido recientemente gran relevancia en el diagnóstico de enfermedades (Costa, 2004). A su vez, el uso de sondas de hidrólisis (ejemplo sonda Taqman) garantiza una alta especificidad de la reacción, evitando la formación de productos inespecíficos.

En este trabajo, se utilizó el sistema de *primers* generales para *R. solanacearum* 759-760 (Opina et al., 1997) y una sonda de hidrólisis (sonda Taqman) para la detección de todas las cepas de *R. solanacearum*. Se evaluó este sistema por medio de la construcción de una curva de calibración a partir de diluciones seriadas al décimo de ADN genómico de *R. solanacearum*. Los resultados obtenidos demostraron una buena sensibilidad y eficiencia de este sistema para la detección de *R. solanacearum*.

A lo largo de los años, diferentes *primers* específicos se han descrito para la detección de todas las cepas de *R. solanacearum* (Seal et al., 1993; Elphinstone et al., 1996; Opina et al., 1997; Fegan et al., 1998; Boudazin et al., 1999; Pastrok y Maiss, 2000; Poussier and Luisetti, 2000; Weller et al., 2000). Sin embargo, dada la diversidad que presenta este patógeno, se ha visto que algunas de estas reacciones tienen baja especificidad lo que introduce el riesgo de que ocurran falsos negativos o falsos positivos de detección (Arahal et al., 2004). En base a estos antecedentes se han diseñado reacciones dirigidas a detectar grupos específicos de cepas de *R. solanacearum*. Fegan y colaboradores (1998) diseñaron el primer par de *primers* de PCR específicos de biovar 2 (630/631). Sin embargo, dicho par de *primers* amplifican una secuencia de DNA que codifica para un elemento genético móvil, lo que limita la confiabilidad y especificidad del método por tratarse de un blanco de detección potencialmente inestable. Recientemente se han diseñado *primers* dirigidos a genes específicos de las cepas pertenecientes al filotipo IIB1, que no constituyen elementos genéticos móviles, por lo que son potencialmente útiles para desarrollar métodos de diagnóstico confiables (Ferreira, 2012; Stulberg et al., 2015; Stulberg et al., 2016).

En resumen, en este trabajo se evaluó la resistencia a marchitez bacteriana en germoplasma de papa generado por INIA mediante ensayos *in vitro*, contribuyendo al desarrollo de nuevas herramientas para el estudio de este patosistema.

---

## 5-APÉNDICES

---

## 1. Medios de cultivo

- **Medio Phi (Kelman, 1954)**

---

Agar	15g
Peptona	10g
Extracto de levadura	1g
Casaminoácidos	1g
Agua destilada	1000ml
Glucosa 20%	25ml
2,3,5 trifeniltetrazolio (TTC) 1%	5ml

---

Preparación: Se realizan las tomas en peso de agar, peptona, extracto de levadura y casaminoácidos y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. Se homogeneiza bien y se ajusta el pH del medio a 7,0. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Se deja termostatar el medio a 45°C y se agregan los correspondientes volúmenes de glucosa y TTC (estos dos últimos componentes se esterilizan previamente por filtración porque se degradan a temperaturas elevadas). El medio completo se reparte asépticamente en placas de Petri de a 20 ml aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las placas se secan a temperatura ambiente y se conservan a 4°C hasta su uso.

Si se desea preparar el medio Phi líquido, el procedimiento para su preparación es el mismo pero no se agrega ni TTC, ni glucosa a la mezcla.

- **Medio Phi (Kelman, 1954) suplementado con gentamicina.**

---

Agar	15g
Peptona	10g
Extracto de levadura	1g
Casaminoácidos	1g
Agua destilada	1000ml
Glucosa 20%	25ml
2,3,5 trifeniltetrazolio (TTC) 1%	5ml
Gentamicina [ ] final 75 µg/ml	2,5ml

---

---

Preparación: Se realizan las tomas en peso de agar peptona, extracto de levadura y casaminoácidos y dichos componentes se disuelven en el correspondiente volumen de agua destilada. Una vez que se homogeiniza bien la mezcla, se ajusta el pH a 7,0. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Se deja termoestatar el medio a 45°C y se agregan en un medio aséptico los correspondientes volúmenes de glucosa, TTC y gentamicina. Estos componentes fueron previamente esterilizados mediante filtrado debido a que se degradan a altas temperaturas. En cabina de flujo laminar se reparte el medio en placas de Petri (20 ml aproximadamente por placa). Una vez solidificado el medio en las placas se procede a su conservación a 4°C hasta su uso.

Si se desea preparar el medio Phi líquido, el procedimiento para su preparación es el mismo pero no se agrega ni TTC, ni glucosa, ni gentamicina a la mezcla.

- **Medio Murashige-Skoog (MS) modificado (Murashige y Skoog, 1962)**

Componente	Cantidad (para 1 litro de medio)
Solución A	20 ml de solución stock
Solución B	20 ml de solución stock
Solución C	20 ml de solución stock
Solución D	20 ml de solución stock
Solución E	20 ml de solución stock
Vitaminas STABA	1 ml de solución stock
Myo-Inositol	200 mg
Sacarosa	30 g
Agar	8 g

Preparación: Se realizan las tomas en peso de myo-inositol, sacarosa y agar y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. En un medio aséptico se agrega el volumen correspondiente de las vitaminas STABA y de las soluciones A, B, C, D y E, las cuales fueron previamente esterilizadas en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Se funde el agar colocando el frasco donde se encuentra la mezcla en horno microondas y se homogeiniza bien. Se deja enfriar a 45-50°C y se ajusta el pH del medio a 5,8. Por último, se reparte en frascos de vidrio aproximadamente 30 ml de medio y se esterilizan los mismos en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Si se desea preparar el medio Murashige-Skoog (MS) modificado líquido, el procedimiento de preparado es el mismo pero no se agrega sacarosa, no se funde el medio en horno microondas y no se reparte en frascos de vidrio sino en tubos. Se colocan 45 ml de medio por tubo, se tapan con algodón y se esterilizan en autoclave durante 15 minutos a 121° C.

---

## Solución Stock de vitaminas STABA

Producto	Cantidad (mg para 100ml)
Ácido fólico	50
Biotina	100
Cloro colina	100
Ácido pantoténico	100
Tiamina	100
Nicotinamida	200
Piridoxina	200
Ácido aminobenzoico	200

Preparación: Se realizan las tomas en peso de cada componente y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. Se disuelven bien los componentes en el agua y se ajusta el pH a 7. Por último se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

## Soluciones Stock del MS

### Solución A: Nitratos

Compuesto	Cantidad (g/1000ml)
Nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ )	95,0
Nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	82,5

### Solución B: Sulfatos

Compuesto	Cantidad (g/1000ml)
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	18,5
Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	0,00125
Sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	1,115
Sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0,430

---

### Solución C: Halógenos

Compuesto	Cantidad (g/1000ml)
Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )	22,0
Yoduro de potasio (KI)	0,0415
Cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0,00125

### Solución D

Compuesto	Cantidad (g/1000ml)
Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	8,5
Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	0,310
Molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0,0125

### Solución E

Compuesto	Cantidad (g/1000ml)
Sodio EDTA ( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	1,896
Sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	1,392

Preparación de las soluciones stock A, B, C, D y E del medio MS: Se realizan las tomas en peso de los componentes de cada solución, se colocan en su respectivo frasco y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. Se esterilizan en autoclave durante 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ . Se dejan enfriar las soluciones y se conservan a  $4^\circ\text{C}$  hasta su uso.

## 2. Buffer de extracción

- **Buffer Fosfato 50 mM pH 7,0 (Anonymous, 2006).**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	4,26g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	2,72g
Agua destilada	1000ml

Preparación: Se realizan las tomas en peso de cada componente y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. Se ajusta el pH del buffer a 7,0. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ .

---

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a María Inés, por su confianza, apoyo y motivación constante durante todo el trabajo de tesis. Sus conocimientos, sus orientaciones y su persistencia han sido fundamentales para mi formación como investigadora.

También quiero agradecer a María Julia, por abrirme las puertas del laboratorio de Microbiología Molecular y permitirme ser parte del grupo de la entrañable *Ralstonia*. Agradezco eternamente por su confianza, apoyo y buena disposición siempre.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Microbiología, por todos los lindos momentos compartidos, por el excelente ambiente de trabajo y por hacerme sentir parte de la Cátedra.

En particular, a mis compañeros del "12": Vicky, MIL, Gaby, Alejandra, Luis, César, Vale, Marianita, Susana, Caro, Rodrigo, Juliette y Belén por su generosidad, por capacitarme en muchas tareas, por todos los favores y sobre todo por crear un ambiente de trabajo tan agradable. También quiero agradecer a Gianna y a Sonia, por sus consejos y por compartir sus conocimientos.

A Virginia, por toda su dedicación a enseñarme todo lo necesario para que este trabajo de tesis pudiera ser llevado a cabo. Agradezco de corazón su paciencia, motivación y compañerismo en todo momento.

A todos los integrantes del Laboratorio de Biotecnología del INIA (Las Brujas), por su ayuda en el trabajo de propagación y multiplicación *in vitro* de las plantas usadas en esta tesis.

A mis amigos de la vida, Vir, Fiore, Nadia, Lucía, Javier y Estrella por estar en las buenas y en las malas y nunca dejarme rendir. Gracias por tantos inolvidables momentos compartidos, por tantas valiosas charlas y por quererme como soy sin intentar cambiarme.

En especial quiero agradecer a mi madre, por su insistencia en mi formación como profesional, por estar ahí con sus palabras cuando me quedaba sin fuerzas ante un fracaso, por ser el pilar de mi vida. Gracias por creer siempre en mí y por ser una madre tan genial. A mi padre, por esforzarse tanto para que nada me faltara, por su orgullo ante mis éxitos y su amor incondicional. A mi hermano, por abrirme las puertas de su casa, por escucharme y ayudarme en todo lo que podía. A mi abuela, que aunque ya no está me inculcó profundamente la importancia de estudiar y superarse en la vida.

Y agradezco infinitamente a mi novio Edu, por acompañarme en todo momento, por darme el apoyo y la fuerza para lograr las cosas que me propongo, por creer en mí y ayudarme a crecer como persona. Gracias por ser el ángel que ilumina mis días.

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Acea M., Moore C., y Alexander M. 1988. Survival and growth of bacteria introduced into soil. *Soil Biol. Biochem.* 20:509–515.
- Acero J.L., Benitez F.J., Real F.J., y Gonzalez M. 2008. Chlorination of organophosphorus pesticides in natural waters. *J. Hazard. Mater.* 153:320–328.
- Agrios G.N. 2005. *Plant Pathology*. 5th Edition. Academic Press, San Diego, CA.
- Aldon D., Brito B., Boucher C., Genin S. 2000. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J.* 19: 2304–2314.
- Allen C., Kelman A., y French E.R. 2001. Brown rot of potatoes. Pages 11–13 in: *Compendium of potato diseases*, 2nd ed. W.R. Stevenson, R. Loria, G.D. Franc, y D.P. Weingartner, eds., APS Press, St. Paul, MN.
- Anguiz R.J. y Mendoza H.A. 1997. General and specific combining abilities for resistance to bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith) in PVX and PVY immune autotetraploid potatoes. *Fitopatologia.* 32: 71-80.
- Anonymous. 2006. Commission Directive 2006/63/EC of 14 July 2006: amending Annexes II to VII to Council Directive 98/57/EC on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. *Off. J. Eur. Communities*, L206, 36-106.
- Arahal D.R., Llop P., Pérez Alonso M., y López M.M. 2004. In silico evaluation of molecular probes for detection and identification of *Ralstonia solanacearum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *System. Appl. Microbiol.* 27:581-591.
- Bendahmane M, Szecsi J, Chen L, Berg RH, Beachy RN. 2002. Characterization of mutant tobacco mosaic virus coat protein that interferes with virus cell-to-cell movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 99: 3645-3650.
- Borboa Flores J., Rueda Puente E.O., Acedo Félix E., Ponce J.F., Cruz M., Grimaldo Juárez O., y García Ortega A.M. 2009. Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Rev. Fitotec. Mex.* 32( 4 ): 319-326.
- Boshou L. 2005. A broad review and perspective on breeding for resistance to bacterial wilt. Pages 225-238 in: *Bacterial Wilt: The Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. C. Allen, P. Prior, y A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St.Paul, MN.
- Boudazin G., Le Roux A.C., Josi K., Labarre P., y Jouan B. 1999. Design of division specific primers of *Ralstonia solanacearum* and application to the identification of European isolates. *Eur. J.Plant Pathol.*105:373–380.

---

Bradshaw J. E., Bryan G. J., y Ramsay G. 2006. Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilisation in potato breeding. *Potato Res.* 49:49-65.

Buddenhagen I.W., Sequeira L., y Kelman A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology.* 52:726.

Bhunchoth A., Phironrit N., Leksomboon C., Chatchawankanphanich O., Kotera S., Narulita E., Kawasaki T., Fujie M. y Yamada T. 2015. Isolation of *Ralstonia solanacearum*-infecting bacteriophages from tomato fields in Chiang Mai, Thailand, and their experimental use as biocontrol agents. *J. Appl. Microbiol.* 118: 1023–1033.

Buddenhagen I. y Kelman, A. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology.* 2: 203-230.

Campbell A. S., Ploetz R. C., y Rollins J. A. 2017. Comparing Avocado, Swamp Bay, and Camphortree as Hosts of *Raffaelea lauricola* Using a Green Fluorescent Protein (GFP)-Labeled Strain of the Pathogen. *Phytopathology.* 107: 70-74.

Canale F., Peralta A. 1983. Determinación de biotipos de *Pseudomonas solanacearum* en aislamientos procedentes de la zona sur de San José. *Revista AIA* 1(2):90-93.

Canale F. 1984. Situación de *Pseudomonas solanacearum* en la República Oriental del Uruguay. Pages 27-33 in: Seminario de Investigación y de Trabajo Sobre Avances en el Control de la Marchitez Bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) de la Papa en América Latina, Lima, Perú.

Carmeille A., Caranta C., Dintinger J., Prior P., Luisetti J., y Besse P. 2006. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo type II resistance in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 113: 110-121.

Carputo D., Castaldi L., Caruso I., Aversano R., Monti L., y Frusciante L. 2007. Resistance to frost and tuber soft rot in near-pentaploid *Solanum tuberosum*–*S. commersonii* hybrids. *Breed. Sci.* 57:145-151.

Caruso P., Bertolini E., Cambra M., y López M.M. 2003. A new and sensitive Co-operational polymerase chain reaction for a rapid detection of *Ralstonia solanacearum* in water. *J. Microbiol. Methods,* 55:257-272.

Caruso P., Palomo J.L., Bertolini E., Álvarez B., López, M.M., y Biosca E.G. 2005. Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river: Recovery of stressed cells at low temperatures. *App. Environ. Microbiol.* 71:140-148.

Castillo J.A., y Greenberg J.T. 2007. Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 1225–1238.

Cellier G, Prior P. 2010. Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. *Phytopathology* 100: 1250-1261.

---

Cellier G., Remenant B., Chiroleu F., Lefeuvre P., y Prior P. 2012. Phylogeny and population structure of brown rot- and Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* phylotype II. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:2367–2375.

Chalupowicz L., Zellermann E.-M., Fluegel M., Dror O., Eichenlaub R., Gartemann K.-H., Savidor A., Sessa G., Iraki N., Barash I., y Manulis-Sasson S. 2012. Colonization and movement of GFP-labeled *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* during tomato infection. *Phytopathology* 102:23-31.

Champoiseau P., Jones J., y Allen C. 2009. *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2 causes tropical Losses and Temperate Anxieties. *Plant Health Progress*. doi: 10.1094/PHP-2009-0313-01-RV.

Ciampi L., y Sequeira L. 1980. Influence of temperature on virulence of race 3 strains of *Pseudomonas solanacearum* potatoes. *Am. Pot. J.* 57: 307-317.

Cook R.J., y Baker K.F. 1983. *The Nature and Properties of Biological Control of Plant Pathogens*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.

Cook D., Barlow E., y Sequeira L. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment length polymorphisms with DNA probes that specify virulence and the hypersensitive response. *Mol. Plant- Microbe Interact.* 2: 113-121.

Cook D., y Sequeira L. 1994. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. Pages 77-93 in: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. A.C. Hayward y G.L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.

Costa J. 2004. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 5: 299-305.

Coutinho T.A. 2005. Introduction and prospectus of the survival of *R. solanacearum*. Pages 29-38 in: *Bacterial Wilt: The Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. C. Allen, P. Prior, y A. C. Hayward, eds. Am Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Cruz A. P. Z., Ferreira V., Pianzola M. J., Siri M. I., Coll N. S., y Valls M. 2014. A novel, sensitive method to evaluate potato germplasm for bacterial wilt resistance using a luminescent *Ralstonia solanacearum* reporter strain. *Mol.Plant-Microbe Interact.* 27:277-285.

Cubero J., Gell I., Johnson E. G., Redondo A. y Graham J.H. 2011. Unstable green fluorescent protein for study of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* survival on citrus. *Plant Pathology*, 60: 977–985.

Czajkowski R., de Boer W.J., Velvis H., y van der Wolf J.M. 2010. Systemic colonization of potato plants by a soilborne, green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. biovar 3. *Phytopathology* 100:134-142.

Dasgupta S., Meisner C., Wheeler D., Xuyen K., y Lam N.T. 2007. Pesticide poisoning of farm workers-implications of blood test results from Vietnam. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210:121–132.

---

Denny T. 2005. A short history of biochemical and genetic research on *Ralstonia solanacearum* pathogenesis. Pages 323-334 in: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Allen C., Prior P., Hayward A.C., eds. APS Press, St. Paul, MN.

Denny T.P. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. Pages 573-644. in: Plant-Associated Bacteria. S.S. Gnanamanickam ed. Springer Publishing, Dordrecht, The Netherlands.

Denny T.P., y Hayward A.C. 2001. *Ralstonia*. Pages 165-189 in: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 3rd Ed. N. W. Schaad, J. B. Jones, y W. Chun, eds. APS Press, St. Paul, MN.

DIEA-MGAP. Caracterización de la producción de papa en Uruguay.  
<http://www.mgap.gub.uy/Diea/Encuestas/default.htm#Papera>

Dorak M. T. 2006. Real-Time PCR. Advanced Methods Series. Taylor y Francis, eds. Oxford, United Kingdom.

Edwards-Jones G. 2008. Do benefits accrue to 'pest control' or 'pesticides?': a comment on Cooper and Dobson. *Crop Prot.* 27:965–967.

Elphinstone J.G. 1996. Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in cool climates. *Pot. Res.*39:403-410.

Elphinstone J.G. 2005. The current bacterial wilt situation: a global overview. Pages 9-28 in: Bacterial Wilt: The Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, y A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Elphinstone J.G., Hennessy J., Wilson J.K., y Stead D.E. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *OEPP/EPPO Bulletin*, 26: 663-678.

Elphinstone J.G., Stanford H.M., y Stead D.E. 1998. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers, *Solanum dulcamara*, and associated irrigation water. Pages 133–139 in: Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. P. Prior, C. Allen, y J. Elphinstone, eds. Springer-Verlag, Berlin.

Englebrecht M.C. 1994. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*. Pages 3-5 in: Bacterial Wilt Newsletter, A.C. Hayward ed. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, Australia.

Fan B., Chen X. H., Budiharjo A., Bleiss W., Vater J., y Borriss R. 2011. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*. 151: 303–311.

Fegan M., Holoway G., Hayward A.C. y Timmis J. 1998. Development of a diagnostic test based on the polymerase chain reaction (PCR) to identify strains of *R. solanacearum* exhibiting the biovar 2 genotype.

---

Pages 34-43 in: Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. P. Prior, C. Allen, y J. Elphinstone, eds. Springer-Verlag, Berlin.

Fegan M., y Prior P. 2005. How complex is the '*Ralstonia solanacearum*' species complex? Pages 449- 461 in: Bacterial Wilt: The Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, y A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St.Paul, MN.

Ferreira V., 2012. Desarrollo de nuevos métodos moleculares para la detección de *Ralstonia solanacearum*. Tesis de Licenciatura en Química. Montevideo. Universidad de la República, Facultad de Química. 78 pág.

French E.R. 1994. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. Pages 199-207 in: Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. A.C. Hayward y G.L. Hartman eds. CAB International, Wallingford, UK.

French E.R., y Sequeira L. 1970. Strains of *Pseudomonas solanacearum* from Central and South America: a comparative study. *Phytopathology*. 60: 506-512.

French E.R., y De Lindo L. 1982. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato: specificity and temperature sensitivity. *Phytopathology*. 72:1408-1412.

French E.R., Anguiz R., y Aley F. P. 1998. The usefulness of potato resistance to *Ralstonia solanacearum* for the integrated control of bacterial wilt. Pages 381-385 in: Bacterial Wilt disease: Molecular and Ecological Aspects. P. Prior, C. Allen, and J. Elphinstone, eds. Springer-Verlag, New York.

Fujie M., Takamoto H., Kawasaki T., Fujiwara A., Yamada T. 2010. Monitoring growth and movement of *Ralstonia solanacearum* cells harboring plasmid pRSS12 derived from bacteriophage  $\phi$ RSS1. *J. Biosc. Bioeng.* 109: 153-158.

Gabriel D.W., Allen C., Schell M., Denny T.P., Greenberg J.T., Duan Y.P., Flores-Cruz Z., Huang Q., Clifford J.M., Presting G., González E.T., Reddy J., Elphinstone J., Swanson J., Yao J., Mulholland V., Liu L., Farmerie W., Patnaikuni M., Balogh B., Norman D., Alvarez A., Castillo J.A., Jones J., Saddler G., Walunas T., Zhukov A., y Mikhailova, N. 2006. Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:69-79.

Gadeva P. y Dimitrov B. 2008. Genotoxic effects of the pesticides Rubigan, Omite and Rovral in root-meristem cells of *Crepis capillaris* L. *Mutat. Res.* 652:191-197.

Galván G., Fraguas F., Quirici L., Santos C., Silvera E., Siri M., Villanueva P., Raudiviniche L. González M., Torres D., Castillo A., Dalla Rizza M., Vilaró F., Gepp V., Ferreira F., y Pianzola M. J. 2006. *Solanum commersonii*: Una especie con gran potencial para el mejoramiento genético de papa por resistencia a *Ralstonia solanacearum*. Pages 87-102 in: Avances de investigación en recursos genéticos en el cono sur I. I. Procisur, ed. Procisur, Montevideo, Uruguay.

Galván G., Franco Fraguas L., Quirici L., Santos C., Silvera E., Siri M.I., Villanueva P., Raudiviniche L., González M., Torres D., Castillo A., Dalla Rizza M., Vilaró F., Gepp V., Ferreira F., Pianzola M.J. 2007.

---

*Solanum commersonii*: una especie con gran potencial para el mejoramiento genético de papa por resistencia a *Ralstonia solanacearum*. Pages 87-101 in: Avances de Investigación en Recursos Genéticos del Cono Sur II. A. Clausen, F. Condón, y A. Berreta, eds. PROCISUR - IICA, Montevideo.

Gaspin C., Lavie M., Moisan A., Robert C., Saurin W., Schiex T., Siguier P., Thebault P., Whalen M., Wincker P., Levy M., Weissenbach J. y Boucher C.A. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. Nature 415:497-502.

Genin S. 2010. Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. New Phytologist. 187:920–928.

Genin S., Boucher C., 2004. Lessons Learned From The Genome Analysis of *Ralstonia solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol, 42: 107-134.

Genoma [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EE.UU.), Centro Nacional de Información Biotecnológica; 2005 - [citado 24 de junio de 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>

Gillings M., Fahy P., Davies C. 1993. Restriction analysis of amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*. Lett. Appl. Microbiol. 17:44-48.

Gillings M.R., y Fahy, P. 1994. Genomic Fingerprinting: towards a unified view of the *Pseudomonas solanacearum* species complex. Pages 95-112 in: Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. A.C. Hayward y G. L. Hartman, eds. Wallingford: CAB Internacional.

Glick D. L., Coffey C. M., y Sulzinski M. A. 2002. Simultaneous PCR detection of the two major bacterial pathogens of geranium. Journal of Phytopathology 150:54-59.

Gonzalez M., Galvan G., Siri M. I., Borges A., y Vilaro F. 2013. Resistencia a la marchitez bacteriana de la papa en *Solanum commersonii* Dun. Agrociencia 17:45-54.

Goszczyńska T., Serfontein J.J., Serfontein S. 2000. Introduction to practical phyto bacteriology. South Africa, Safrinet Pretoria. 83p.

Graham J., y Lloyd A. B. 1979. Survival of potato strain (race 3) of *Pseudomonas solanacearum* in the deeper soil layers. Aust. J. Agric. Res. 30:489-96.

Graham J., Jones D. A., Lloyd A. B. 1979. Survival of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in debris and latently infected potato tubers. Phytopathology 69:1100-03.

Granada, G. A. Sequeira, L. 1983. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere and plant roots. Can. J. Microbiol. 29:433-40.

Greer L. F., III y Szalay A. A. 2002. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. Luminescence 17:43-74.

- 
- Grey B.E., y Steck T.R. 2001. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3866-3872.
- Grimault V., Prior P., y Anais G. 1995. A monogenic dominant resistance of tomato to bacterial wilt in Hawaii 7996 is associated with plant colonization by *Pseudomonas solanacearum*. *J. Phytopathol.* 143: 349-352.
- Guarisch-Sousa R., Puigvert M., Coll N. S., Siri M. I., Pianzola M. J., Valls M., Setubal J. C. 2016. Complete genome sequence of the potato pathogen *Ralstonia solanacearum* UY031. *Standards in Genomic Sciences* 11:7.
- Guidot A., Prior, P., Schoenfeld J., Carrere S., Genin S., y Boucher C.A. 2007. Genomic structure and phylogeny of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from gene distribution analysis. *J. Bacteriol.* 189:377-387.
- Guidot A., Elbaz M., Siri M.I., Pianzola M.J., Prior P. and C. Boucher. 2009. Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* (phylotype IIB, sequevar 1 historically known as race 3, biovar 2 strains) and their potential use for strain detection. *Phytopathology* 99(9): 1105-1112.
- Hayward A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J Appl. Bacteriol.* 27:265–77.
- Hayward A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:65–87.
- Hayward A.C. 1994a. Systematics and phylogeny of *Pseudomonas solanacearum* and related bacteria. Pages 123-135 in: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. A.C. Hayward y G.L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- Hayward A.C. 1994b. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. Pages 9-24 in: *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. A.C. Hayward y G.L. Hartman, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- He Y.L., Sequeira L., y Kelman A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Dis.* 67:1357-1361.
- Hendrick C., y Sequeira L. 1984. Lipopolysaccharide-defective mutants of the wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:94-101.
- Hikichi Y., Nakazawa-Nasu Y., Kitanosono S., Suzuki K., y Okuno T. 1999. The behavior of lux-marked *Ralstonia solanacearum* in grafted tomato cultivars resistant or susceptible to bacterial wilt. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 65:597-603.
- Hong J., Ji P., Momol M. T., Jones J. B., Olson S. M., Pradhanang P., y Guven K. 2005. *Ralstonia solanacearum* detection in tomato irrigation ponds and weeds. Pages 309-311 in: *Proceedings of the First*
-

---

International Symposium on Tomato Disease, International Society for Horticultural Science, Orlando, FL, U.S.A.

Howe K., Karsi A., Germon P., Wills R.W., Lawrence M.L. y Bailey R.H. 2010. Development of stable reporter system cloning *luxCDABE* genes into chromosome of *Salmonella enterica* serotypes using Tn7transposon. BMC Microbiol. 10: 197.

Huet G. 2014. Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. Frontiers in Plant Science. 5: 1-5.

Iglesia A., Alvarez E., Martínez Y., García A. 2008. Molecular Diagnostic of the bacterial wilt. Rev. Protección Veg. 23( 2 ): 75-79.

INASE. Estándares específicos para la producción de materiales de propagación de papa (*Solanum tuberosum*) de la clase certificada. Instituto Nacional de Semillas.  
<http://www.inase.org.uy/especiesCultivares/EstandaresEspecificos.aspx>

Janse J.D. 1991. Infra- and intraspecific classification of *Pseudomonas solanacearum* strains, using whole cell fatty acid analysis. Systematic and Applied Microbiology 14: 335-345.

Janse J.D., Van der Beld H.E., Elphinstone J., Simpkins S., Tjou-Tam-Sin N.N.A., Van Vaerenbergh J. 2004. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. J. Plant Pathol. 86:147–155.

Jaunet T.X., y Wang J. F. 1999. Variation in genotype and aggressiveness diversity of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. Phytopathology 9:320–327.

Kawasaki T., Nagata S., Fujiwara A., Satsuma H., Fujie M., Usami S., Yamada T. 2007. Genomic characterization of the filamentous integrative bacteriophage  $\phi$ RSS1 and  $\phi$ RSM1, which infect *Ralstonia solanacearum*. J. Bacteriol., 189: 5792-5802.

Kelman A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. Phytopathology. 44: 693-695.

Kishun R., Sohi H. S. 1982. Vertical distribution of *Pseudomonas solanacearum* in cultivated and fallow lands. Zentralblatt für Mikrobiologie. 137: 643-645.

Kohlmeier S., Mancuso M., Tecon R., Harms H., van der Meer J. R., y Wells M. 2007. Bioreporters: *gfp* versus *lux* revisited and single-cell response. Biosens. Bioelectron. 22:1578-1585.

Krausz J. P., Thurston H. D. 1975. Breakdown of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in tomato. Phytopathology 65: 1272-74.

Lambert, C.D. 2002. Agricultural bioterrorism protection act of 2002: Possession, use, and transfer of biological; agents and toxins; interim and final rule. (7 CFR Part 331). Federal Register 67:76908-76938.

- 
- Lebeau A., Gouy M., Daunay M.C., Wicker E., Chiroleu F., Prior P., et al. 2013. Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. *Theor. Appl. Genet.* 126: 143–158.
- Lelis F. M. V., Czajkowski R., de Souza R. M., Ribeiro D. H., van der Wolf J. M. 2014. Studies on the colonization of axenically grown tomato plants by a GFP-tagged strain of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Eur. J. Plant Pathol.* 139:53-66.
- Li, X., Liu, Y., Cai, L., Zhang, H., Shi, J. y Yuan, Y. 2017. Factors affecting the virulence of *Ralstonia solanacearum* and its colonization on tobacco roots. *Plant Pathol.* 1-12.
- Liao, X., Zhu, S., Zhao, W., Luo, K. y Qi, Y. 2003. Detection and identification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* by real-time fluorescent PCR. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 43, 626–34.
- Lin C.-H., Hsu S.-T., Tzeng K.-C., y J.-F. Wang. 2009. Detection of race 1 strains of *Ralstonia solanacearum* in field samples in Taiwan using a BIO-PCR method. *Eur. J. Plant Pathol.* 124:75–85.
- López M.M. y Biosca E.G. 2005. Potato bacterial wilt management: new prospects for an old problem. Pages 205-224 in: *Bacterial Wilt: The Disease and the Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, y A.C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Mangin, B., Thoquet, P., Olivier, J., y Grimsley, N.H. 1999. Temporal and multiple quantitative trait loci analyses of resistance to bacterial wilt in tomato permit there solution of linked loci. *Genetics* 151:1165-1172.
- Mansfield J., et al. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13:614-629.
- Martin, C., Nydegger, U. 1982. Susceptibility of *Cyphomandra betacea* to *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis.* 66: 1025-27.
- Martin C., y French E. R. 1985. Bacterial wilt of potatoes caused by *Pseudomonas solanacearum*. CIP Technical Information Bulletin. 13:1-6. CIP, Lima, Peru.
- Mc. Laughlin, R.J. y Sequeira, L. 1989. Phenotypic diversity in strains of *Pseudomonas solanacearum* isolated from a single potato field in Northeastern Florida. 73:960-964.
- Mew T. W., Ho W. C. 1977. Effect of soil temperature on resistance of tomato cultivars to bacterial wilt. *Phytopathology* 67:909-11.
- Meighen E. A. 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.* 55:123-142.
- Michel V., Mew T.W. 1998. Efect of a Soil Amendment on the Survival of *Ralstonia solanacearum* in Different Soils. *Phytopathology* 88: 300-305.
-

---

Montanelli C., Chiari A., Chiari T., Stefanini F., y Nascari G. 1995. Evaluation of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato under controlled conditions. *Euphytica* 81:35-43.

Monteiro, F., Genin, S., van Dijk, I., y Valls, M. 2012a. A luminescent reporter evidences active expression of *Ralstonia solanacearum* type III secretion system genes throughout plant infection. *Microbiology* 158:2107-2116.

Monteiro F., Sole M., van Dijk I., y Valls M. 2012b. A chromosomal insertion toolbox for promoter probing, mutant complementation, and pathogenicity studies in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:557-568.

Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

Narancio R., Zorrilla P., Robello C., Gonzalez M., Vilaro F., Pritsch C., y Dalla-Rizza M. 2013. Insights on gene expression response of a characterized resistance genotype of *Solanum commersonii* Dun. against *Ralstonia solanacearum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 136:823-835.

Olmos, S.; Luciani, G. y Galdeano, E. 2004. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Páginas 161-172 en: Biotecnología y mejoramiento vegetal. G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski, eds. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina.

Opina N., Tavner F., Hollway G., Wang J.-F., Li T.-H., Maghirang R., Fegan M., Hayward, A.C., Krishnapillai V., Hong W.-F., Holloway B.W., y Timmis J.N. 1997. A novel method for development of species and strain specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia-Pac J. Mol. Biol.* 5:19-30.

Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M. 1988. Developments in quantitative PCR. *Clin. Chem. Lab. Med.* 36(5):255-69.

Palleroni, N. J. & Doudoroff, M. 1971. Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology.* 107:690-696.

Pastrik K.H. y Maiss E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction. *J. Phytopathol.* 148:619– 626.

Pastrik K.H., Elphinstone J.G. y R. Pukall. 2002. Sequence analysis and detection of *Ralstonia solanacearum* by multiplex PCR amplification of 16S-23S ribosomal intergenic spacer region with internal positive control. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 831–842.

Peeters N., Guidot A., Vaillau, F., y Valls M. 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Mol. Plant Pathol.* 14: 651–662.

Pegg K. y Moffett M. 1971. Host range of the ginger strain of *Pseudomonas solanacearum* in Queensland. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.* 11:696-698.

- 
- Pianzzola M.J., Zarantonelli L., González G., Franco Fraguas L., y Vázquez A. 2005. Genetic, phytochemical and biochemical analyses as tools for biodiversity evaluation of wild *Solanum commersonii* accessions. *Biochem. Syst. Ecol.* 33:67-78.
- Poussier S., Vandewalle P., y Luisetti J. 1999. Genetic diversity of African and worldwide strains of *Ralstonia solanacearum* as determined by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hrp* gene region. *App. Environ. Microbiol.* 65:2184-2194.
- Poussier S. y Luisetti J. 2000. Specific detection of biovars of *R. solanacearum* in plant tissue by nested PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 106:255-265.
- Poussier S., Prior P., Luisetti J., Hayward A.C., y Fegan M. 2000. Partial sequencing of the *hrpB* and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Syst. Appl. Microbiol.* 23:479-486.
- Pradhanang P.M., Elphinstone J.G., y Fox R.T.V. 2000a. Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hill of Nepal. *Plant Pathol.* 49:403–413.
- Pradhanang P.M., Elphinstone J.G. y Fox R.T.V. 2000b. Sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil: a comparison of different detection techniques. *Plant Pathol.* 49: 414-422.
- Prior P., Steva H., y Cadet P. 1990. Aggressiveness of strains of *Pseudomonas solanacearum* from the French West Indies (Martinique and Guadeloupe) on tomato. *Plant Disease.* 74:962-965.
- Prior P., Ailloud F., Dalsing B.L., Remenant B., Sanchez B., Allen C. 2016. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. *BMC Genomics* 17:90.
- Priou S., Torres R., Villar A., Gutarra L., y De Mendiburu F. 2001. Optimization of sample size for the detection of latent infection by *Ralstonia solanacearum* in potato seed tubers in the highlands of Peru. *Pot. Res.* 44:349–58.
- Priou S., Aley P., y Gutarra L. 2005. Assessment of resistance to bacterial wilt in CIP advanced potato clones. Pages 261-267 in: *Bacterial Wilt: The Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. C. Allen, P. Prior, y A.C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Qian, Y.L., Wang, X.S., Wang, D.Z., Zhang, L.N., Zu, C.L., Gao, Z.L., et al. 2013. The detection of QTLs controlling bacterial wilt resistance in tobacco (*N. tabacum* L.). *Euphytica* 192: 259-266.
- Quimby, F.C., L.R. King, and W.E., Grey. 2002. Biological control as a means of enhancing the sustainability of crop/land management systems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 88:147–152.
-

---

Rajasekaran K., Cary J.W., Cotty P.J., Cleveland T.E. 2008. Development of a GFP-expressing *Aspergillus flavus* strain to study fungal invasion, colonization, and resistance in cottonseed. *Mycopathologia*, 165:89-97.

Remenant B., Coupat-Goutaland B., Guidot A., Cellier G., Wicker E., Allen C., Fegan M., Pruvost O., Elbaz M., Calteau A., Salvignol G., Mornico D., Mangenot S., Barbe V., Médigue C. y Prior P. 2010. Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics*, 11:379.

Roberts, S. J., Eden-Green, S. J., Jones, P., & Ambler, D. J. 1990. *Pseudomonas syzygii* sp. nov., the cause of Sumatra disease of cloves. *Systematic and Applied Microbiology*. 13:34-43.

Sabuquillo P., Gea A., Matas I.M., Ramos C., y Cubero J. 2017. The use of stable and unstable green fluorescent proteins for studies in two bacterial models: *Agrobacterium tumefaciens* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Arch. Microbiol.* 199(4):581-590.

Saddler G.S. 2005. Management of bacterial wilt disease. Pages 121-132 in: *Bacterial Wilt: The Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. C. Allen, P. Prior, y A.C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., Kappler, U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64(3):3087–3103.

Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisne, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J. and Boucher, C.A. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*. 415: 497-502.

Sanchez Perez A., Mejia L., Fegan M., y Allen C. 2008. Diversity and distribution of *Ralstonia solanacearum* strains in Guatemala and rare occurrence of tomato fruit infection. *Plant Pathol.* 57:320-331.

Schaad NW, Cheong SS, Tamaki S, Hatziloukas E, Panopoulos NJ, 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology*. 85: 243–248.

Schaad, N. W., Berthier-Schaad, Y., Sechler, A., and Knorr, D. 1999. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and an automated real-time fluorescence detection system. *Plant Dis.* 83:1095-1100.

- 
- Schaad N., Jones J.B., Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd. Edition. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA.
- Schaad, N.W., Opgenorth, D. and Gauth, P. 2002. Real-Time Polymerase Chain Reaction for One-Hour On-Site Diagnosis of Pierce's Disease of Grape in Early Season Asymptomatic Vines. *Phytopathology*. 92: 721–8.
- Schell, M.A. 2000. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory array. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38:263–292.
- Schonfeld J., Heuer H., Van Elsas J.D., y Smalla K. 2003. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *fliC* fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7248-7256.
- Schreinemachers, P., y Tipraqsa, P. 2012. Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. *Food Policy* 37:616–626.
- Seal, S. E. 1998. Molecular methods for detection and discrimination of *Ralstonia solanacearum*. Pages 103-109 in: *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*. Ph. Prior, C. Allen, y J. Elphinstone, eds. Springer-Verlag, Berlin.
- Seal S.E., Jackson L.A., y Daniels M.J. 1992. Isolation of a *Pseudomonas solanacearum*-specific DNA probe by subtraction hybridization and construction of species-specific oligonucleotide primers for sensitive detection by the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3751–3758.
- Seal S.E., Jackson L.A., Young J.P.W., Daniels M.J. 1993. Differentiation of *P. solanacearum*, *P. syzygii*, *P. pickettii* and the blood disease bacterium by partial 16 S rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J. Gen. Microbiol.* 139:1587–1594.
- Seal S.E., Taghavi M., Fegan N., Hayward A.C. y Fegan M. 1999. Determination of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* rDNA subgroups by PCR tests. *Plant Pathol.* 48:115-120.
- Siri M.I., Villanueva P., Pianzola M.J., Franco Fraguas L., Galván G., Acosta M., Ferreira F. 2005. In vitro antimicrobial activity of different accessions of *Solanum commersonii* Dun from Uruguay. *Pot. Res.* 47:127-138.
- Siri, M. I., Galván, G. A., Quirici, L., Silvera, E., Villanueva, P., Ferreira, F., Fraguas, L. F., y Pianzola, M. J. 2009. Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. *Euphytica* 165:371-382.
- Siri M.I., 2010. Estudio genómico comparativo de las cepas de *Ralstonia solanacearum* causantes de la marchitez bacteriana de la papa en Uruguay. Tesis de Doctorado en Química. Montevideo. Universidad de la República, Facultad de Química. 186 pág.
-

---

Siri, M. I., Sanabria, A., y Pianzola, M. J. 2011. Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. *Plant Dis.* 95:1292-1301.

Skerman V.B.D., McGowan V., y Sneath P.H.A. 1980. Approved lists of bacterial names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30:225-420.

Stulberg, M.J., Shao, J., and Huang, Q. 2015. A multiplex PCR assay to detect and differentiate select agent strains of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Dis.* 99:333-341.

Stulberg M.J., Huang Q. 2015. A TaqMan Based Multiplex qPCR Assay and DNA Extraction Method for Phylotype IIB Sequevars 1&2 (Select Agent) Strains of *Ralstonia solanacearum*. *PLoS ONE.* 10:e0139637.

Stulberg M.J., Rascoe J., Li W., Yan Z., Nakhla M.K., y Huang Q. 2016. Development and Comparison of TaqMan-Based Real-Time PCR Assays for Detection and Differentiation of *Ralstonia solanacearum* strains. *Curr. Microbiol.* 73(4):542-9.

Swanson J.K., Yao J., Tans-Kersten J.K., y Allen C. 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent active infection of geranium. *Phytopathology* 95:136-143.

Taghavi, M., Hayward, C., Sly, L. I., y Fegan, M. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 46:10-15.

Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. 2 (2): 70-78.

Tancos, M. A., Chalupowicz, L., Barash, I., Manulis-Sasson, S., y Smart, C. D. 2013. Tomato fruit and seed colonization by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* through external and internal routes. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (22):6948-6957.

Tejeda, Y. 2006. Caracterización de *Ralstonia solanacearum* a través del estudio de su diversidad genética. *Fitosanidad* 4 10:299-303.

Thurston H.D. 1963. Bacterial wilt of potatoes in Columbia. *Am. Pot. J.* 40:381-390.

Tozzini, A. C., Cerioani, M. F., Saladrigas, M. V., and Hopp, H. E. 1991. Extreme resistance to infection by potato virus in genotypes of wild tuber-bearing *Solanum* species. *Potato Res.* 34:317-324.

Tse C, Capeau J. 2003. Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids. *Ann. Biol. Clin. (Paris).* 61(3):279-93.

Tung, P. X., Rasco, E. T. Jr., Vander Zaag, P., y Schmediche, P. 1990. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato. II. Aspects of host pathogen environment interaction. *Euphytica* 45: 211-15.

---

- 
- Valasek M.A., y Repa J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.* 29: 151–159.
- Van Elsas, J. D., y L. S. van Overbeek. 1993. Bacterial responses to soil stimuli. Pages 55–79 in: *Starvation in bacteria*. A. Kjelleberg ed., Plenum, New York, N.Y.
- Vilaró, F., Rodríguez, G., y Pereira, G. Jornada sobre Mejoramiento de Papa. Actividad de difusión N° 221. INIA, 2000.
- Villa J., Tsuchiya K., Horita M., Natural M., Opina N., y Hyakumachi M. 2005. Phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* species complex strains from Asia and other continents based on 16S rDNA, *egl*, and *hrpB* gene sequences. *J. Gen. Plant Pathol.* 71:39-46.
- Wang, J.F., Olivier, J., Thoquet, P., Mangin, B., Sauviac, L., y Grimsley, N.H. 2000. Resistance of tomato line Hawaii 7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13: 6-13.
- Wang K., Kang L., Anand A., Lazarovits G., y Mysore K. S. 2007. Monitoring *in planta* bacterial infection at both cellular and whole-plant levels using the green fluorescent protein variant GFPuv. *New Phytologist.* 174: 212–223.
- 1
- Wang, J.F., Ho, F.I., Truong, H.T.H., Huang, S.M., Balatero, C.H., Dittapongpitch, V., et al. 2013. Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar “Hawaii 7996” to *Ralstonia solanacearum*. *Euphytica* 190:241-252.
- Weller S.A., Elphinstone J.G., Smith N.C., Boonham N., y Stead D.E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2853-2858.
- Whipps, J. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52:487–511.
- Whipps, J.M., y Gerhardson, B. 2007. Biological pesticides for control of seed- and soil-borne plant pathogens. Pages 479–501 in: *Modern Soil Microbiology 2nd Edition*. J.D. Van Elsas, J.D. Jansson, y J.T. Trevors eds., CRC Press, FL.
- Williams, S. T. 1985. Oligotrophy in soil: fact or fiction?. Pages 81–110 in: *Bacteria in the natural environment: the effect of nutrient conditions*. M. Fletcher y G. Floodgate eds., Academic Press, New York, N.Y.
- Williamson L., Nakaho, K., Hudelson, B. and C. Allen. 2002. *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2 isolated from Geranium are pathogenic on potato. *Plant Disease.* 86: 987-991.
- Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., Yano I., Hotta H., Hashimoto Y., Ezaki T., y M. Arakawa. 1992. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immun.* 36:1251-1275.
-

---

Yabuuchi E., Kosako Y., Hano I., Hotta H., y Nishiuchi Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.: proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni, y Douderoff 1973) comb, nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb nov. Microbiol. Immun. 39:897-904.

Yamada T. 2012. Bacteriophages of *Ralstonia solanacearum*: their diversity and utilization as biocontrol agents in agriculture. Pages 113-138 in: Bacteriophages. Kurtböke I ed., InTech, Croacia.

Yao J., y Allen C. 2006. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. J. Bacteriol. 188: 3697–3708.