

*Tesina para el grado de Licenciatura en Bioquímica.*

**EVALUACIÓN DE RESISTENCIA A RALSTONIA  
SOLANACEARUM EN UNA COLECCIÓN NÚCLEO DE  
PARIENTES SILVESTRES DE PAPA.**

**VALENTINA STANCOV VÁZQUEZ**

Orientadoras: Dras. Paola Gaiero<sup>1</sup> y María Inés Siri<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Evolución y Domesticación de las Plantas, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía.

<sup>2</sup>Laboratorio de Microbiología Molecular, Departamento de Biociencias, Facultad de Química.

*Montevideo, 2021.*

# Índice

Resumen.....	3
1.Introducción.....	4
1.1 El cultivo de papa.....	4
1.1.1 Generalidades.....	4
1.1.2 Parientes silvestres en Uruguay.....	5
1.2 La marchitez bacteriana de la papa causada por <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	6
1.2.1 Generalidades del patógeno.....	8
1.2.2 Ciclo de la enfermedad.....	9
1.2.3 Infecciones latentes.....	10
1.2.4 Estrategias de manejo.....	10
1.2.5 Resistencia genética.....	11
1.2.6 Utilización de parientes silvestres.....	12
1.3 Valorización de recursos genéticos como fuente de resistencia.....	13
1.3.1 Programas de mejoramientos genético.....	13
1.3.2 Colección núcleo.....	13
2.Objetivos.....	16
2.1 Objetivo general.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3.Materiales y métodos.....	17
3.1 Preparación del material vegetal.....	17
3.2 Preparación del inóculo.....	19
3.3 Evaluación de resistencia.....	20
3.4 Evaluación de latencia.....	21
3.5 Análisis estadístico.....	23
4.Resultados.....	25
4.1 Evaluación de resistencia a la marchitez bacteriana en una colección núcleo de parientes silvestres de papa y en germoplasma del programa de mejoramiento genético de papa de INIA.....	25
4.2 Detección de infecciones latentes a nivel de tallo en accesiones asintomáticas.....	33
5.Discusión.....	36
6.Conclusiones.....	40
7.Anexos.....	41
8.Agradecimientos.....	48
9.Bibliografía.....	49

## Resumen

La marchitez bacteriana es una enfermedad causada por el complejo de especies *Ralstonia solanacearum*, capaz de afectar diferentes tipos de cultivos, entre ellos el de papa (*Solanum tuberosum* L.). Estudios previos han demostrado que parientes silvestres de la papa pueden utilizarse como fuente de resistencia a esta enfermedad, siendo ésta una de las estrategias en la cual se basa el programa de mejoramiento genético de papa de INIA. Durante los últimos años se realizaron colectas de diferentes genotipos de papa silvestre (*S. commersonii*, *S. chacoense* y *S. malmeanum*) alrededor del país, con los cuales se generó una colección núcleo representativa de la diversidad existente. Esta colección núcleo tiene un acervo genético muy importante, por lo cual, es de sumo interés poder caracterizarla en función de diversos atributos fenotípicos de interés. El objetivo principal de esta tesis fue evaluar la resistencia a marchitez bacteriana que posee la colección núcleo, para valorizar este germoplasma e identificar nuevas fuentes de resistencia para su aprovechamiento en programas de mejoramiento por introgresión en la papa comercial. En este marco, se realizaron dos ensayos independientes para dicha evaluación, uno se llevó a cabo desde diciembre de 2019 a enero de 2020, y el segundo de septiembre a noviembre de 2020. Ambos ensayos se realizaron bajo condiciones controladas en el solarío del Centro Regional Sur de la Facultad de Agronomía. En ambos ensayos se inoculó, ocasionando daño de raíz, la cepa UY031 de *R. solanacearum*, una cepa aislada en Uruguay y de alta agresividad en papa. Luego de la inoculación se realizaron evaluaciones de los síntomas desarrollados en cada planta y con estos datos se realizó un análisis comparativo de la resistencia de cada accesión. Por último, se seleccionaron los genotipos que permanecieron asintomáticos al final del ensayo, y se les realizó un análisis para determinar la ocurrencia de infecciones latentes. Para ello se utilizó un procedimiento de BIO-multiplex-PCR, utilizando *primers* generales de *R. solanacearum* y *primers* específicos para la cepa UY031. Se complementó con la cuantificación de la bacteria mediante recuento en placa. El análisis estadístico realizado permitió observar los efectos de diferentes variables en el avance de la enfermedad, tales como la especie, el genotipo, el tiempo y sus interacciones. De esta forma se determinó que, tanto la especie como la interacción del genotipo con el momento de la evaluación no fueron significativos para ambos ensayos. Por lo tanto, las especies se comportaron de forma similar y por otro lado, la evolución de los síntomas fue similar entre los diferentes genotipos. En el primer ensayo se encontraron diferencias significativas entre los genotipos evaluados, mientras que el segundo fue más agresivo y todos los genotipos fueron afectados sin distinguir niveles de resistencia entre ellos. Dentro de los genotipos de la colección núcleo se destacaron A11P1, C14P1, C6P1, RN3P1, para los cuáles la mayoría de las plantas inoculadas permanecieron asintomáticas o mostraron un retardo en la aparición de sus síntomas. El nivel de resistencia observado en estos genotipos fue incluso mejor que el observado para el clon 09.509.6, el testigo con mejor comportamiento. Por otro lado, el ensayo de evaluación de latencia de los genotipos asintomáticos mostró que ciertos genotipos como A11P1 y 09.509.6 no presentaron este tipo de infecciones, mientras que otros tenían infecciones latentes solo en algunas réplicas. Los resultados de este trabajo evidencian que la resistencia a la infección por *R. solanacearum* es un rasgo complejo y con una alta variabilidad en las especies silvestres emparentadas con la papa cultivada. La caracterización realizada permitió seleccionar genotipos de *S. commersonii* y *S. malmeanum* con altos niveles de resistencia y baja ocurrencia de infecciones latentes los cuales representan recursos genéticos valiosos para el programa de mejoramiento genético de papa.

# 1. Introducción

## 1.1 El cultivo de papa

### 1.1.1 Generalidades

La papa (*Solanum tuberosum* L.,  $2n=4x=48$ ) pertenece a la familia de las solanáceas y es un cultivo de suma relevancia a nivel mundial (Machida-Hirano y Niino, 2017), siendo el tercero más importante luego del trigo y el arroz. Esto se debe a que los tubérculos que produce se utilizan como alimento, incluso con el rol de la principal fuente de carbohidratos en muchos pueblos. En este marco, cabe destacar que se encuentra en el tercer puesto de cultivos más consumidos por el humano (CIP, 2021), debido a la alta concentración de azúcares que posee, además de proteínas, fibras, vitaminas, minerales y antioxidantes (Storey, 2007; Bradshaw y Ramsay, 2009).

Este cultivo es plantado en 149 países (Bradshaw et al., 2006), dentro de los cuales se encuentra Uruguay. En nuestro país, se siembran aproximadamente 3500 ha de este cultivo en promedio al año, consiguiendo rendimientos de 21 t/ha aproximadas (MGAP, 2020). Las zonas de producción varían según la estación del año, destacándose el sur (Canelones y San José) en otoño, el este (Rocha) en las estaciones más cálidas y el norte en invierno (Vilaró, 1990). La época de cultivo depende también del destino final de la producción, pudiendo ser papa para consumo o su utilización como tubérculos-semilla (Vilaró, 1990). Todo esto conlleva a que sea el cultivo hortícola de más importancia en el país, tanto a nivel de producción como por superficie total plantada (Casares, 2020).

Existen diversas hipótesis sobre la evolución y el origen de la papa (De Haan y Rodriguez, 2016). Naturalmente la papa como especie domesticada surgió en la región de los Andes en América del Sur (Simmonds, 1995; Spooner et al., 2005) y no fue conocida en el resto del mundo hasta el siglo XVI (Machida-Hirano y Niino, 2017). No obstante, hoy en día se cultiva en diferentes regiones del mundo con climas templados (Bradshaw, 2010), siempre y cuando se tengan condiciones adecuadas de agua (Govindakrishan y Haverkort, 2006). Además, existen diversos cultivares adaptados a diferentes condiciones de altitud, clima y estreses abióticos (Bradshaw y Ramsay, 2009).

En relación a la taxonomía, la papa forma parte de la sección Petota del género *Solanum* (Hawkes, 1990) que engloba todas las especies que tuberizan (Spooner y Salas, 2006). En este taxón, además de incluirse la papa que conocemos tradicionalmente como *S. tuberosum* (tbr), es decir, la papa cultivada, existe una gran diversidad de especies silvestres que están emparentadas con la misma. Existen 107 especies silvestres (Machida-Hirano y Niino, 2017), todas ellas se encuentran distribuidas a lo largo del continente americano (Spooner et al., 2014); en particular en América del Sur se encuentran en la región de Venezuela, Argentina, Chile, Paraguay, Perú, Bolivia, Uruguay y el sur de Brasil (Bradshaw y Ramsay, 2009). En el continente existen dos centros de diversidad de especies salvajes: uno en México y otro en los Andes (Machida-Hirano y Niino, 2017). Esta amplia distribución, tanto territorial como de diversas altitudes, indican su gran adaptación y versatilidad (Spooner y Hijmans, 2001). Los territorios que habitan son diversos, incluyendo desde desiertos hasta bosques (Machida-Hirano y Niino, 2017); esto se puede evidenciar en su diversidad fenotípica (Hanneman, 1989).

En cuanto a su composición genómica, las papas cultivadas y silvestres tienen un número básico de 12 cromosomas ( $n=12$ ), pero presentan diferentes niveles de ploidía; por ejemplo, las papas cultivadas pueden ser desde diploides ( $2n=2x=24$ ) hasta pentaploides ( $2n=5x=60$ ), mientras que las silvestres suelen ser diploides, pero pueden llegar a ser hasta incluso hexaploides ( $2n=6x=72$ ) (Spooner y Hijmans,

2001; Spooner et al., 2014). Generalmente, las especies diploides son autoincompatibles (Dodds, 1965) mientras que las tetraploides y las hexaploides son autocompatibles y alopoliploides (Hawkes, 1990).

Los parientes silvestres de la papa presentan diversas características favorables, desde adaptaciones a distintos climas hasta resistencias a enfermedades (Hawkes, 1990; Spooner y Hijmans, 2001; Bradshaw y Ramsay, 2009). Esta alta diversidad y complejidad genética (Machida-Hirano, 2015) causó que estas plantas nativas hayan ganado protagonismo en los últimos años (Machida-Hirano, 2015; Bethke et al., 2017). La gran variabilidad de diferentes cualidades como resistencia a enfermedades, plagas, alto poder nutritivo, entre otras, las convierte en un recurso genético de mucha utilidad en el mejoramiento de cultivos (Castañeda-Alvarez et al., 2015; Machida-Hirano, 2015; Bethke et al., 2017). Es por esto que se han realizado diversas colectas desde el año 1920 (Hawkes, 1990; Castañeda-Alvarez et al., 2015) que se mantienen en una red mundial de bancos de germoplasma (Bradshaw y Ramsay, 2009; Castañeda-Alvarez et al., 2015).

### 1.1.2 Parientes silvestres en Uruguay

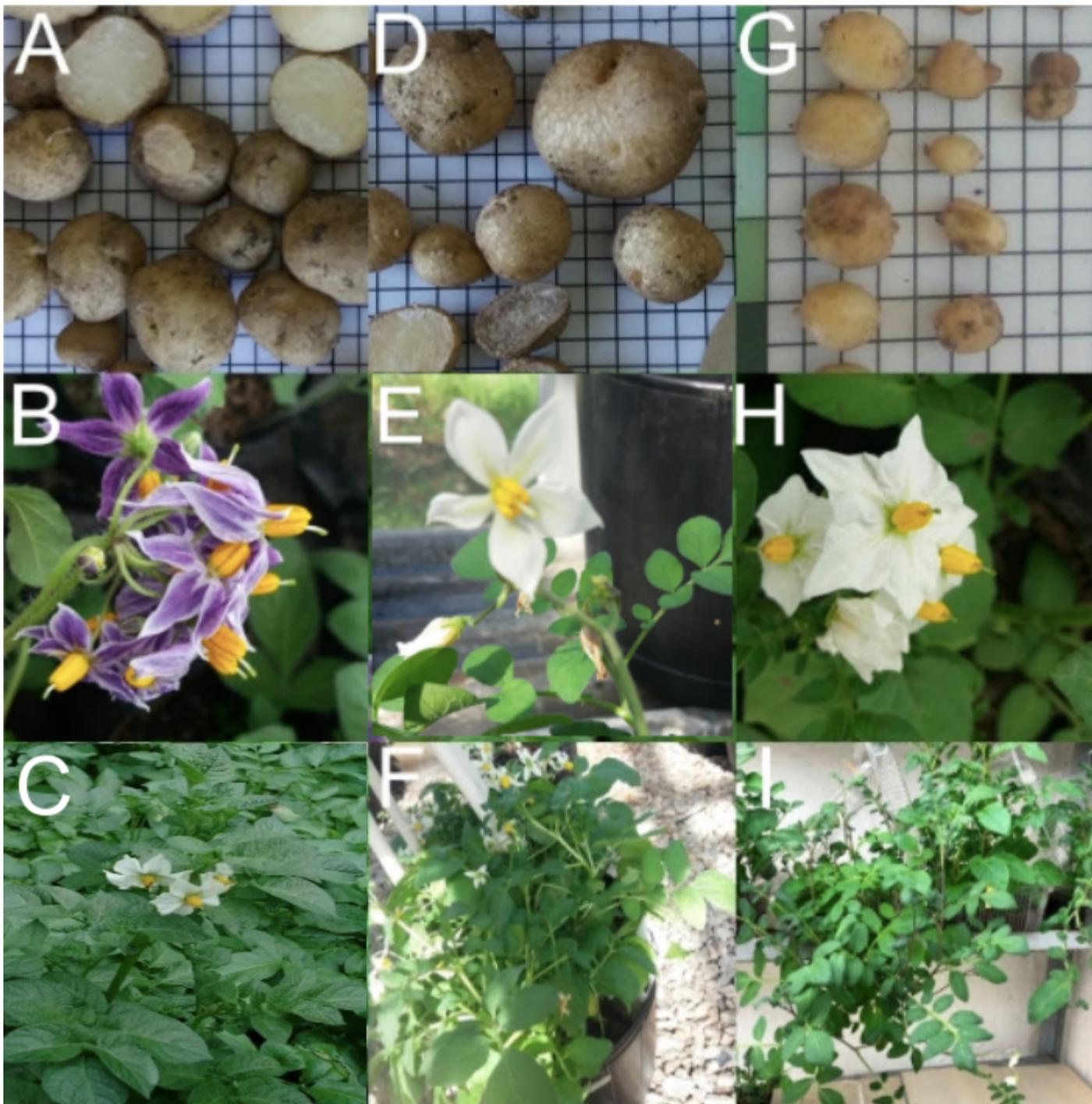
Existen diferentes parientes silvestres de papa en Uruguay que presentan una gran diversidad a nivel morfológico, genético y fisiológico (Pianzzola et al., 2005; Siri et al., 2009; Prieto et al., 2016). Esta diversidad sin igual hace que el germoplasma se adapte a diferentes hábitats, nichos y suelos (Machida-Hirano, 2015). Además de la variabilidad genética, también poseen una gran variabilidad morfológica, ya que la forma de los tubérculos, las flores, tamaño de la planta, etcétera, varían entre accesiones (Hanneman, 1989). Todo lo mencionado anteriormente es de suma importancia para la utilización de los mismos en programas de mejoramiento genético (Machida-Hirano, 2015)

Uno de los parientes silvestres que se destaca es *S. commersonii* (cmm), una especie tuberosa diploide ( $2n=2x=24$ ) (Hawkes, 1990), con excepción de algunos clones triploides (Tarn y Hawkes, 1986). Esta especie es nativa de Uruguay, Argentina y Brasil (Hawkes, 1990). En Uruguay se encuentra distribuida en todo el territorio, sobre todo en el sur y el noreste (Abad-Njers, 2020). Es una especie que tiene un prominente foliolo terminal y el cáliz posee sépalos de forma ovalada (Hawkes, 1990) (fig. 1 A, B, C). Se reproduce por propagación vegetativa y de forma sexual (autoincompatible), y produce gametos no reducidos. Dentro de sus características fisiológicas se distinguen su tolerancia a las temperaturas extremas como el frío y el calor (Palta et al., 1981) y resistencia a diferentes enfermedades causadas por hongos, bacterias, nematodos y virus (Laferriere et al., 1999; Galván et al., 2007; Spooner et al., 2009; Cai et al., 2011; Patil et al., 2012).

Otra especie importante es *S. malmeanum* (mlm), la cual previamente era considerada como una subespecie dentro de cmm, debido a que comparten muchas similitudes morfológicas (Clausen et al., 2013; Spooner et al., 2014) tales como los foliolos laterales y terminales (Hawkes, 1990) (fig. 1 D, E, F). Es una planta herbácea que forma estolones y tuberiza, las hojas son verdes y pinnadas, las flores son siempre blancas y los frutos verdes (Nicolao, 2021). Esta especie, como cmm, es diploide pero también presenta accesiones triploides (Spooner et al., 2014). Es originaria de Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay (Spooner et al., 2014); en el caso de Uruguay se encuentra en el noroeste del país, sobre el litoral (Castro et al., 2006; Abad-Njers, 2020).

Por otro lado, la especie *S. chacoense* (chc) también es diploide (Mandujano Sanchez, 2007; Spooner et al., 2014). Es una especie oriunda de Argentina, Bolivia, Paraguay, Perú y Uruguay (Spooner et al., 2014). En Uruguay se encuentran sólo algunos registros (Abad-Njers, 2020). Es una hierba de 20 a 150 cm de largo con hojas pinnadas con de tres a ocho foliolos laterales (Morton, 1976) (fig. 1 G, H, I). A nivel mundial es de las especies más utilizadas en mejoramiento genético, por lo que posee muchos recursos

genéticos y genómicos, incluso todo su genoma secuenciado y ensamblado (Leisner et al., 2018). Particularmente se destaca por ser utilizada como fuente de resistencia a virus (Bradshaw, 2007).



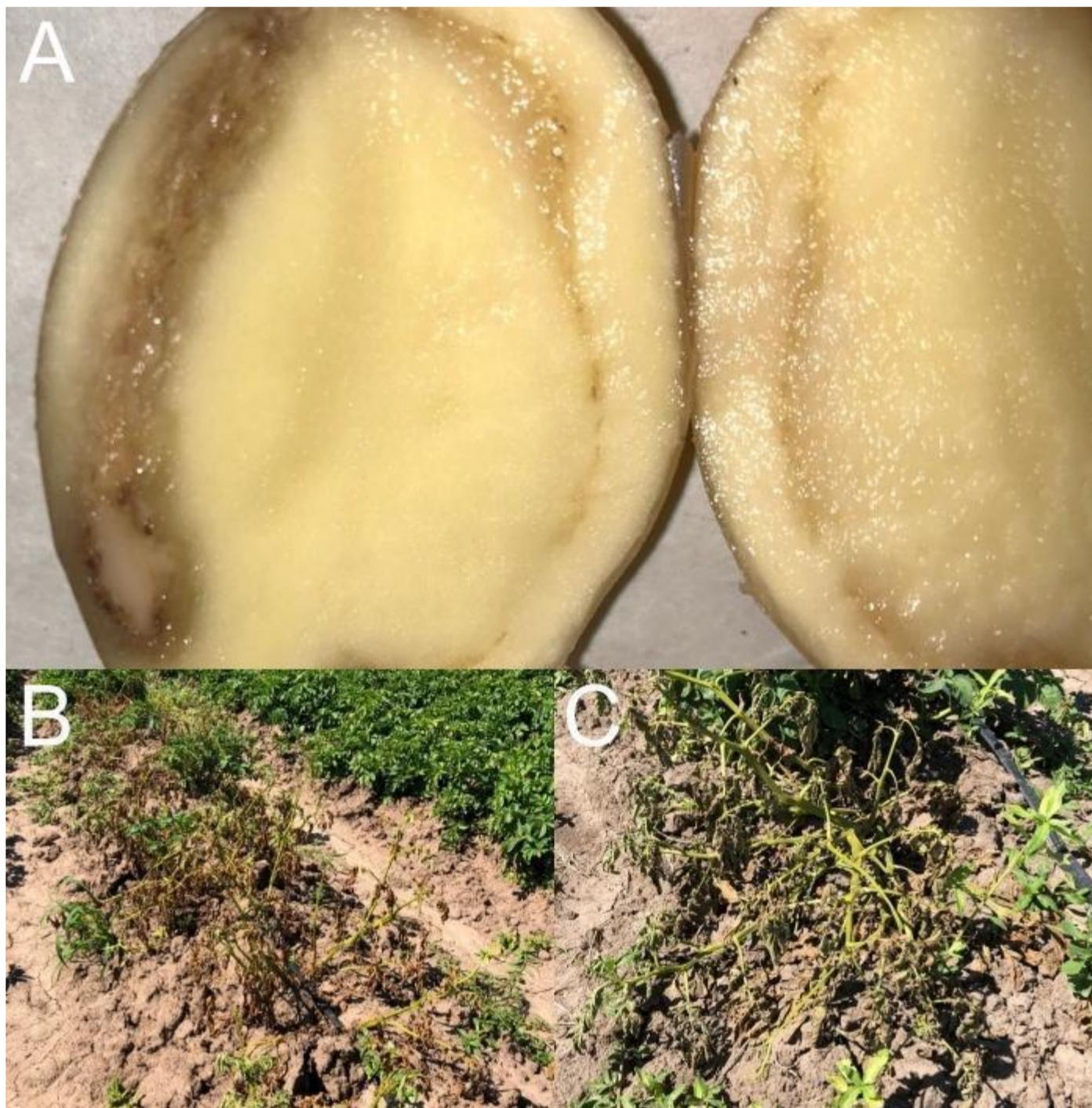
**Figura 1:** Fotografías de los parientes silvestres de la papa nativos de Uruguay. La primera columna (**A**, **B** y **C**) contiene fotografías de la especie *Solanum commersonii*, a nivel de tubérculo, flor y follaje. La segunda columna (**D**, **E** y **F**) de *Solanum malmeanum*. La última columna (**G**, **H** e **I**) de *Solanum chacoense*. Fuente: la fotografía **G** fue tomada por Natali Hernandez, las **A**, **B**, **D**, **E**, **F** y **H** por la Dra. Paola Gaiero.

### 1.2 La marchitez bacteriana de la papa causada por *Ralstonia solanacearum*

La marchitez bacteriana es una enfermedad que causa estragos en diversos cultivos a nivel mundial (Hayward, 1994). En el caso del cultivo de papa, es también conocida como “murchera” o “podredumbre parda”, causando importantes pérdidas en regiones subtropicales y de clima templado (Martin y French, 1985; Hayward, 1991; Elphinstone, 2005; Patil et al., 2012). En Uruguay, este patógeno afecta principalmente a los cultivos de papa, con brotes esporádicos pero severos, provocando daños que presentan dificultades a la hora de prevenir y controlar (Siri, 2010).

Los síntomas de la enfermedad son iguales a los que provoca la falta de riego en el cultivo: marchitez, amarillamiento de las hojas y retraso del crecimiento (Martin y French, 1985) (fig. 2). La sintomatología

también puede incluir la epinastia y raíces adventicias que crecen en el tallo (Álvarez et al., 2010). Las plantas que no presentan los síntomas previamente mencionados, pueden desarrollar otros como enanismo (Lopes et al., 2015). Sin embargo, el primer síntoma que aparece es el marchitamiento de las hojas superiores que va progresando paulatinamente. La sintomatología de la enfermedad es tal debido a que la bacteria coloniza los tejidos vasculares, específicamente los vasos del xilema (Peeters et al., 2013), bloqueando el transporte del agua por la planta (Buddenhagen y Kelman, 1964). Tanto la expresión de los síntomas como la velocidad a la que se produce la enfermedad dependen tanto de la susceptibilidad del hospedero como de la agresividad de la cepa (Álvarez et al., 2010).



**Figura 2:** Síntomas característicos de marchitez bacteriana en cultivos de papa. **(A)** Corte transversal de tubérculo con presencia de exudados bacterianos en la zona de los haces vasculares. **(B)** y **(C)** Plantas a campo con síntomas de marchitamiento en tallo y hojas. Fuente: fotografías tomadas por la Dra. Virginia Ferreira durante un brote en un predio en Empalme Olmos, Canelones, diciembre de 2017.

Si se realiza un corte transversal del tallo se puede observar la presencia de una coloración marrón a nivel de los tejidos vasculares y un exudado color blanco (Martin y French, 1985; Milling et al., 2011), dicho exudado es un polisacárido extracelular conocido como zooglea que la bacteria lo utiliza como método de protección. En el caso de los tubérculos de papa, este compuesto también exuda desde los anillos vasculares, los cuales se decoloran y pudren, hasta que todo el tubérculo es destruido (Álvarez et

al., 2010). Una vez que la bacteria ha colonizado toda la planta, esta colapsa, sin embargo en general sigue manteniendo su color verde (Martin y French, 1985).

### 1.2.1 Generalidades del patógeno

*R. solanacearum* es una bacteria gram negativa aerobia móvil con forma de bacilo cuya característica más importante es que produce la enfermedad conocida como marchitez bacteriana (Genin y Boucher, 2004; Patil et al., 2012). Este fitopatógeno tiene la particularidad de poseer una gran cantidad de hospederos, específicamente más de 400, los cuales pertenecen a más de 50 familias botánicas (Patil et al., 2012). La familia más afectada a nivel económico es la Solanaceae, incluyendo varios cultivos como la papa, el tomate, la berenjena, el morrón y el tabaco (Denny, 2006). *R. solanacearum* es un patógeno de distribución global que se encuentra en seis de los siete continentes (Fegan y Prior, 2005).

Esta bacteria pertenece a la familia de las Proteobacterias (Busse y Auling, 1988; Stackebrandt et al., 1988; Genin y Boucher, 2004). Hasta hace poco era considerada un complejo de especies debido a su alta heterogeneidad (Fegan y Prior, 2005) tanto fisiológica, como serológica y genética (Patil et al., 2012). Estudios de la última década habían concluido que se podía clasificar en diferentes filotipos, basándose en análisis filogenéticos de las secuencias de la región ribosomal intergénica del 16S-23S y los genes de endoglucanasa y *mutS*. Este análisis clasifica a la especie en cuatro filotipos del I al IV (Fegan y Prior, 2005; Peeters et al., 2013). El filotipo II se originó en América (Fegan y Prior, 2005; Liu et al., 2009) y tiene dos sub-clusters: el IIA y el IIB (Fegan y Prior, 2005). Los filotipos a su vez se subdividen en secuevares, definidos como *clústeres* de aislamientos con secuencias de ADN altamente conservadas (Fegan y Prior, 2005). Más recientemente, investigaciones de Safni et al (2014) mediante análisis de secuenciación genómica, compararon ocho genomas completos de cepas representantes de los diferentes filotipos y propusieron la clasificación en diferentes especies. Las cepas pertenecientes al filotipo I y III fueron asignadas a la especie *R. sequeirae*, las del filotipo IV a la especie *R. haywardii* y las del II se mantienen como *R. solanacearum*. En nuestro país, estudios de Siri et al. (2011) determinaron que los cultivos de papa se encuentran afectados por cepas del filotipo IIB secuevar 1, el cual es predominante en climas templados (Denny, 2006). Este tipo de cepas tiene alta virulencia y capacidad de producir infecciones latentes asintomáticas que favorecen su diseminación (Siri et al., 2011; Cellier et al., 2012). Particularmente la cepa UY031, utilizada en esta tesis, es una cepa de alta agresividad, que pertenece a este secuevar y fue aislada de tubérculos de papa en Uruguay en 2003 (Siri et al., 2009; Siri et al., 2011).

A nivel fenotípico este fitopatógeno mide de 0.5-0.7 a 1.5-2.5  $\mu\text{m}$  (Denny y Hayward, 2001; Patil et al., 2012) y cuando sus flagelos están presentes son polares (Tans-Kersten et al., 2001). Su metabolismo es oxidativo y estrictamente aerobio (Álvarez et al., 2010), no obstante, bajo ciertas circunstancias puede crecer, aunque las células no estén en contacto directo con el aire (Denny y Hayward, 2001). Dentro de las características bioquímicas que posee, se destacan que es oxidasa positiva, arginina hidrolasa negativa, no provoca hidrólisis del almidón y su crecimiento se inhibe en presencia de bajas concentraciones de sal (Buddenhagen y Kelman, 1962; Denny y Hayward, 2001; Denny, 2006). Además, puede reducir nitrato, producir ácidos utilizando disacáridos como intermediarios y oxidar ciertos tipos de alcoholes (Goszczyńska et al., 2000). Como reserva energética utiliza los gránulos de poly- $\beta$ -hidroxibutirato que produce de forma intracelular (Denny y Hayward, 2001).

En cuanto a sus condiciones de crecimiento, las temperaturas mínima y máxima respectivamente son 8-10°C y 37-39°C (EPPO, 2004; Singh et al., 2014). En concreto, la temperatura óptima de crecimiento en zonas tropicales es 35°C y en zonas más frías 27°C (Álvarez et al., 2010). Respecto a las condiciones de

pH favorables, el crecimiento de *R. solanacearum* se inhibe en medios ácidos, pero se favorece en condiciones de leve alcalinidad (Álvarez et al., 2010).

### 1.2.2 Ciclo de la enfermedad

El ciclo infeccioso de *R. solanacearum* se basa en la capacidad que tiene el fitopatógeno de infectar las raíces de un hospedero susceptible (fig. 3) (Genin, 2010). Es un patógeno de suelo, por lo tanto, el ciclo comienza con un estadio saprofítico de la bacteria, es decir, con su supervivencia en ese ambiente (Genin, 2010; Xue et al., 2020). Debido a esto, debe ser capaz de resistir todos los factores de estrés ambiental asociados con este hábitat, por lo que su supervivencia está sobre todo controlada por la humedad y temperatura del suelo, como también el tipo de suelo, cantidad de nutrientes y otros microorganismos que habitan allí (Hayward, 1991). Esto hace que el suelo sea una de las fuentes de inóculo más importantes del patógeno, junto con los tubérculos semilla infectados (Xue et al., 2020). En la papa semilla sobrevive sin ser detectado debido a infecciones latentes asintomáticas (Martin, 1985). La comercialización de semilla contaminada causa la dispersión a nivel internacional de la enfermedad. La supervivencia del patógeno tanto en el suelo como en los tubérculos se debe además a su capacidad de permanecer en un estado de dormancia (Grey y Steck, 2001; Caruso et al., 2005).

En el ambiente, el fitopatógeno detecta estímulos específicos y se mueve hacia el hospedero (Tans-Kersten et al., 2001), donde va a encontrar condiciones más favorables de supervivencia (Yao y Allen, 2006a; 2006b; 2007). El movimiento *per se* se da gracias a flagelos y fimbrias que la bacteria posee (Tans-Kersten et al., 2001; Liu et al., 2001; Kang et al., 2002) y es promovido por quimiotaxis, ya que la raíz de la planta hospedera exuda determinados aminoácidos y ácidos orgánicos que promueven la adherencia y la eficiencia de la colonización (Yao y Allen, 2006a). También ocurre un proceso denominado aerotaxis que colabora en dicha atracción (Yao y Allen, 2006b; 2007). Posteriormente, se da la invasión a un hospedero susceptible, entrando a sus tejidos (Genin, 2010). La infección ocurre a nivel radicular, es decir, la bacteria ingresa mediante heridas provocadas por el surgimiento de raíces laterales (Genin, 2010; Xue et al.; 2020), por el trabajo del hombre en la tierra (Genin, 2010) e incluso por infección de nematodos como *Meloidogyne* sp. (Buddenhagen y Kelman, 1964).

Una vez que el patógeno ingresó al sistema radicular, progresa su invasión a través de las raíces, multiplicándose de forma masiva en los espacios intercelulares entre las células de la corteza, causando plasmólisis de células epidérmicas (Xue et al., 2020). En el último estadio, la bacteria coloniza el xilema (Vasse et al., 1995; Yao y Allen, 2006b; Genin, 2010; Xue et al., 2020). Para poder realizar lo mencionado anteriormente, *R. solanacearum* secreta enzimas que degradan la pared celular vegetal (Schell, 2000). Luego, se propaga de forma sistémica y comienzan a aparecer los síntomas característicos de marchitamiento, debido a la oclusión de los vasos xilemáticos (Genin, 2010, Xue et al., 2020). A su vez se va extendiendo de forma muy rápida hacia la parte aérea (Genin y Boucher, 2004) impulsada por el flujo de transpiración (Vasse et al., 1995). Por último, se produce la muerte de la planta (Álvarez et al., 2010). Esto provoca que el patógeno retorne al suelo y se propague por ambientes acuosos (Genin, 2010) y por plantas que funcionan como hospederos alternativos (Denny et al., 1990) como por ejemplo ciertas malezas y otros cultivos (Wenneker et al., 1999; Pradhanang et al., 2000).



**Figura 3:** Ciclo de la marchitez bacteriana. **(a)** Microscopía electrónica de la cepa de *Ralstonia solanacearum* GMI 1000. **(b)** Observación con microscopio confocal de la bacteria atacando la superficie de las células de la planta. **(c)** Visualización del patógeno en la superficie de la raíz de una planta de tomate mediante microscopía de fluorescencia. **(d)** Test de flujo: crecimiento bacteriano en un tallo de tomate infectado. Esquema adaptado de Genin (2010), extraído de Ferreira (2019).

### 1.2.3 Infecciones latentes

Existen plantas asintomáticas, las cuales pueden presentar infecciones latentes (Stevenson et al., 2001). Las infecciones latentes ocurren en cultivares tolerantes a la marchitez bacteriana y en algunos aparentemente resistentes, aunque esto depende de la cepa del patógeno (Ciampi et al., 1980). Lo más común es que este tipo de infecciones aparezcan en los genotipos que poseen resistencia parcial a la enfermedad (Ferreira, 2019). Generalmente, ocurren cuando los tubérculos semilla son producidos en zonas más frías y luego se transportan a lugares con condiciones de altas temperaturas y humedad ambiental (Martin, 1985). Esto se debe a que esas condiciones ambientales son las que fomentan que los síntomas sean visibles (Graham et al., 1979; Nyangezi et al., 1984).

Los tubérculos infectados son uno de los lugares en donde la bacteria logra sobrevivir más tiempo (Graham et al., 1979), esto provoca que el inóculo primario de la enfermedad generalmente sea el uso de tubérculos semilla contaminados que permanecen asintomáticos (García, 1976; Harris, 1976; Olsson, 1976; Patil et al., 2012). Esto ocurre ya que la sintomatología generalmente se presenta en el tallo, para que se manifieste en el tubérculo tiene que haber una infección muy severa (Martin, 1985). Por lo tanto, encontrar fuentes de resistencia sin infecciones latentes es fundamental para evitar el contagio y propagación de la enfermedad (Charkowski et al., 2020).

### 1.2.4 Estrategias de manejo.

La marchitez bacteriana es una de las enfermedades de cultivos más difíciles de controlar (Saddler, 2005). El manejo presenta dificultades debido a que el patógeno tiene una amplia cantidad de hospederos muy diversos, sobrevive en el suelo (Buddenhagen y Kelman, 1964) y existe una variabilidad genética

importante entre las diferentes cepas (Álvarez et al., 2010; Yuliar y Toyota, 2015). Esto ha llevado a que se investiguen diversas maneras para erradicar la enfermedad. Por ejemplo, se han utilizado diversos compuestos de naturaleza química, sin embargo, se llegó a la conclusión de que no existe ninguna forma de control químico que sea totalmente efectiva a la vez que posea practicidad a la hora de su ejecución (Martin, 1985; Patil et al., 2012). Esto puede deberse a que *R. solanacearum* posee genes de resistencia tanto a metales como a diferentes compuestos químicos (Genin y Boucher, 2004). Sumado a esto, el control químico, nunca es la mejor opción debido a que es una forma de manejo muy dañina para el medioambiente (Huet, 2014).

En consecuencia, se ha planteado la utilización del control biológico utilizando diferentes especies de bacterias (Smith et al., 1992), hongos (Ceballos et al., 2014) y mutantes avirulentos de *R. solanacearum* (Huet, 2014). Sin embargo, por más de que haya resultados prometedores, aún no se ha demostrado una efectividad total a campo (Huet, 2014). Paralelamente, se están desarrollando técnicas biotecnológicas de control como la introducción de péptidos antimicrobianos (lectinas, inhibidores enzimáticos, entre otros) (Bohlman, 1994), genes de defensa vegetal y genes de resistencia (Patil et al., 2012). No obstante, la utilización de técnicas de ingeniería genética para la generación de transgénicos tiene varias complicaciones (Patil et al., 2012) y aún no se ha podido optimizar.

Por lo tanto, se plantean mecanismos de evasión de la enfermedad, como por ejemplo, utilizar siempre papa semilla sana, evitar heridas en las raíces cuando se cultiva, rotación de cultivos (Smith et al., 1992), entre otras (Martin, 1985). Estas medidas de manejo integrado, sumadas a la utilización de cultivares resistentes a la enfermedad, son lo ideal para evitar la enfermedad (Tung et al., 1993; Huet, 2014), ya que el control genético es la única forma de control prometedora.

### 1.2.5 Resistencia genética

Para que un cultivar sea resistente debe cumplir los siguientes requisitos: la resistencia debe perdurar en el tiempo, el cultivar además debe de tener características agronómicas deseadas, debe de sobrevivir en ambientes muy diversos y debe de ser resistente a todas las cepas (Huet, 2014). En este contexto, cumpliendo estas condiciones, se han encontrado y desarrollado cultivares con resistencia genética a la marchitez bacteriana en plantas de tabaco (Hayward, 1991). Sin embargo, en la papa sólo se han desarrollado cultivares parcialmente resistentes (Sequeira, 1979; Martin, 1979). Actualmente no se disponen de cultivares comerciales cuya resistencia perdure (Charkowski et al., 2020).

En un comienzo los clones resistentes se generaban por cruzamientos entre *tbr* y *S. tuberosum* Grupo Phureja (Thurston y Lozano, 1968), no obstante, estos no son resistentes a todas las cepas de *Ralstonia solanacearum* (Ciampi et al., 1980) y asimismo la resistencia se pierde fácilmente por en condiciones de cultivo a altas temperaturas (French, 1972). Posteriormente, se comenzaron a utilizar otras fuentes de resistencia (Martin, 1985). En este marco, se ha generado un clon conocido como Cruza 148, producto del cruzamiento entre *tbr* y *S. demissum*, que ha sido seleccionado por los mejoradores debido a su resistencia parcial a la marchitez bacteriana (Martin, 1979). No obstante, se descubrió que sufre de infecciones latentes (French, 1988). Esto es muy peligroso puesto que colabora con la diseminación de la enfermedad (Hayward, 1991).

La falta de cultivares con inmunidad a la enfermedad ha llevado a la utilización de diferentes tipos de germoplasma (Martin, 1985), sobre todo tratando de valorizar el germoplasma autóctono (Huet, 2014). En esta búsqueda se han incluido diferentes genotipos silvestres entre ellos *chc* (Chen et al., 2013) y *cmm* (Watanabe et al., 1992; Laferriere et al., 1999; Kim-Lee et al., 2005; Carputo et al., 2009; Gonzalez et al., 2013; Chen et al., 2013). Estas dos especies junto con *mlm* son nativas de Uruguay y presentan una diversidad morfológica, química, genética muy amplia (Pianzola et al., 2005; Siri et al., 2009; Prieto et al.,

2016). Estas especies autóctonas, sobre todo cmm, han sido caracterizadas y evaluadas para determinar su potencial como fuentes de resistencia a diversas enfermedades (Cardi et al., 1993; Carputo et al., 1997; Laferriere et al., 1999; Kim-Lee et al., 2005). Específicamente en el caso de cmm y chc se encontró mucha variabilidad en cuanto a la resistencia a la enfermedad provocada por *R. solanacearum* entre diferentes accesiones (Vazquez et al., 1997; Micheletto et al., 2000; Gonzalez et al., 2013).

#### 1.2.6 Utilización de parientes silvestres

Las especies silvestres de la papa han sido usadas en programas de mejoramiento genético desde hace más de 100 años (Machida-Hirano, 2015). Su utilización en los programas de mejoramiento genético a nivel mundial radica en la riqueza de diversidad que las accesiones de estas especies poseen (Bethke et al., 2017), sobre todo a nivel adaptativo (Shah et al., 2020). Se ha visto que pueden llegar a mejorar la calidad de los tubérculos y aportar resistencias y tolerancias (Jansky y Peloquin, 2006; Bradshaw, 2009).

En el caso de la papa, tanto mlm como cmm y chc son recursos utilizados para este propósito en diferentes países (Micheletto et al., 2000; Siri et al., 2009; Bashir et al., 2021). Se seleccionan accesiones que tengan cierta característica de interés, como por ejemplo resistencia a una enfermedad y que a su vez puedan cruzarse o sean especie puente para los posteriores cruzamientos con tbr (Jansky, 2006). En particular la introgresión de resistencia a la marchitez bacteriana a partir de este tipo de especies es dificultosa debido a que es poligénica y además se introgresan caracteres no deseados (Charkowski et al., 2020). Las tres especies nativas mencionadas anteriormente tienen la particularidad de que tuberizan. Sin embargo, dichos tubérculos son pequeños, con estolones largos, dormancia; además tienen contenido variable de glicoalcaloides (Altesor et al., 2014), todas características silvestres que son consideradas negativas y que por lo tanto se seleccionan en contra cuando se usan en programas de mejoramiento genético.

La resistencia desde especies silvestres ha sido transferida de forma exitosa a la papa cultivada mediante fusión de protoplastos (Laferriere et al., 1999; Fock et al., 2001; Kim-Lee et al., 2005), mediante híbridos somáticos (Fock et al., 2000; Chen et al., 2013) y por vía sexual. En el caso de esta última vía, se han logrado transferencias de genes específicos de resistencia de mlm a tbr (Tu et al., 2021) y de cmm a tbr (Carputo et al., 2009).

En Uruguay se han realizado varias evaluaciones, sobre todo de cmm, concluyendo que algunas accesiones de este germoplasma tienen resistencia a la marchitez bacteriana (Gonzalez et al., 2013; Ferreira et al., 2017; Ferreira, 2019), lo cual se puede evidenciar, entre otras cosas, por ejemplo, mediante la presencia de genes relacionados con la síntesis de proteínas de defensa vegetal (Narancio, 2011). Con el mismo propósito también se ha evaluado a mlm, encontrándose accesiones resistentes y medianamente resistentes (Siri et al., 2009).

En particular, cmm ha mostrado diversos grados de resistencia frente a la marchitez bacteriana en más de 30 accesiones evaluadas (Siri et al., 2005; Pianzola et al., 2005; Galvan et al., 2007; Siri et al., 2009; Gonzalez et al., 2013; Ferreira et al., 2017). Esposito et al. (2008) descubrieron la presencia de metabolitos en genotipos resistentes que desencadenan una interacción entre planta y patógeno de carácter incompatible. Estos permiten que la enfermedad se detenga cuando comienza la infección y que en caso de que se desarrollen síntomas los mismos sean leves y tardíos (Esposito et al., 2008). Se ha verificado que, en los genotipos con resistencia parcial a marchitez bacteriana, la colonización y multiplicación del patógeno se ven restringidas, lo que lleva a un enlentecimiento y disminución de la severidad de los síntomas (Ferreira et al., 2017). Esto posiciona a cmm como una de las especies más prometedoras para utilizar en los programas de mejoramiento genético. A nivel molecular, se ha descrito

en varias especies que la resistencia a la marchitez bacteriana es cuantitativa y está controlada por varios genes (Huet, 2014). En papa existen cinco QTLs de resistencia a cepas del filotipo I, los cuales se encuentran en 5 cromosomas distintos (Habe et al., 2019). En cmm existen regiones en el cromosoma 4 y además SNPs asociados a la resistencia (Akinyi, 2020). Diversos estudios realizados en cmm muestran herencia cuantitativa y transgresiva tanto en accesiones silvestres como en cruzamientos interespecíficos (Gonzalez, 2010; Gonzalez et al., 2013) y en retrocruzas avanzadas (Andino et al., 2021). La resistencia de las especies silvestres, particularmente cmm, tiene diferentes componentes, por lo tanto, se producen respuestas fenotípicas diferentes. Las bases genéticas están relacionadas principalmente con genes de defensa o involucrados en la producción de especies reactivas de oxígeno (Narancio et al., 2013; Zuluaga et al., 2015). Las plantas que se mantienen asintomáticas lo logran debido a cambios fenotípicos como producción de tilosis, engrosamiento de paredes celulares y vasos del xilema por deposición de calosa y lignina, hiperplasia de tejido vascular, acumulación de especies reactivas del oxígeno (Ferreira et al., 2017) y aumento de la concentración de calcio en los tejidos (Ferreira, 2019).

### 1.3 Valorización de los recursos genéticos como fuentes de resistencia

#### 1.3.1 Programas de mejoramiento genético

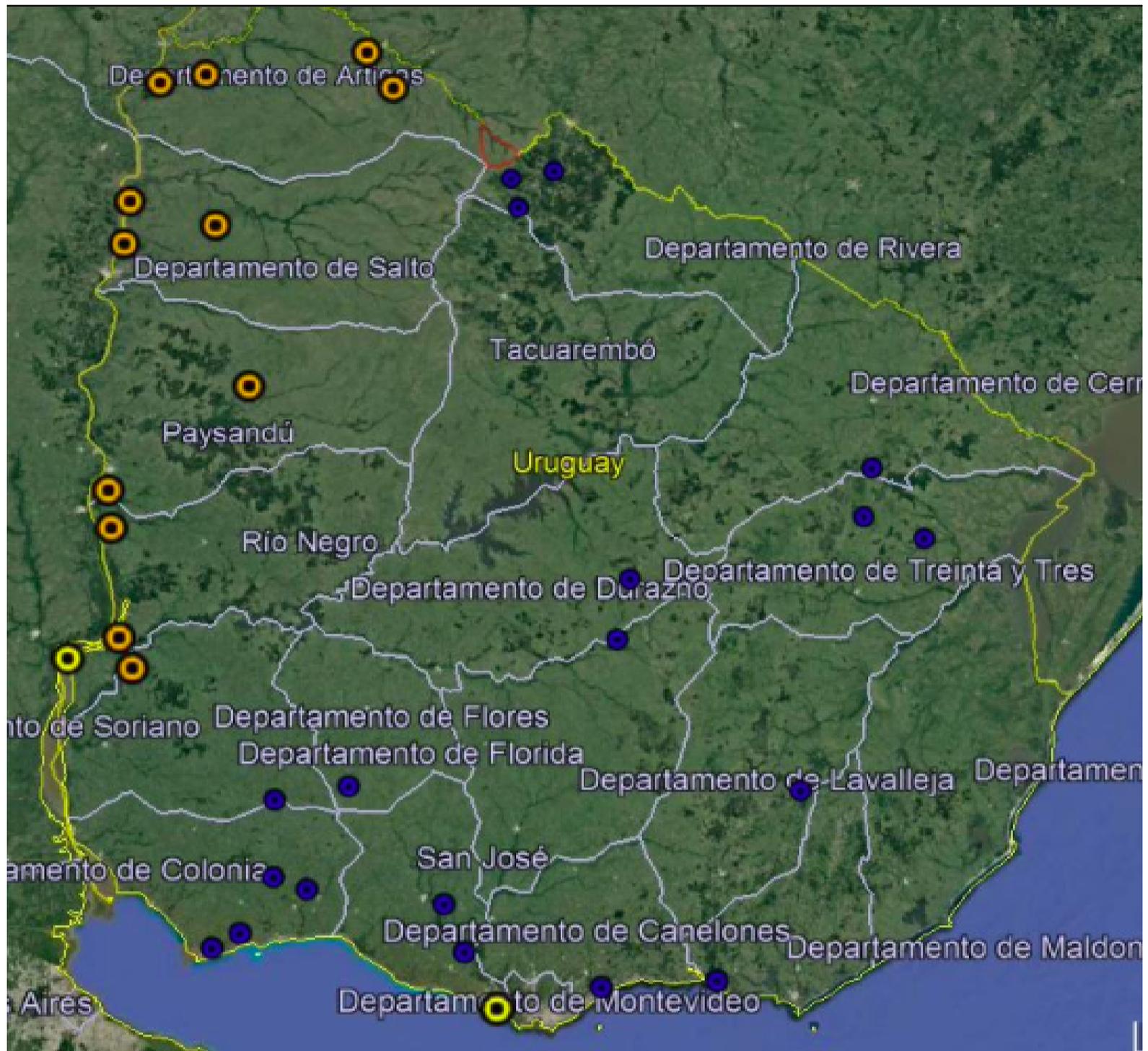
Existe en Uruguay un programa nacional de mejoramiento genético de papa, que es llevado a cabo por el INIA hace ya varias décadas, específicamente desde 1983 (INIA, 2017). Este programa ha empleado germoplasma diverso, particularmente muy resistente a diversas enfermedades. Esto ha llevado a la liberación de diferentes cultivares al sector productivo. En INIA, se ha utilizado germoplasma de origen silvestre como aporte de resistencia a enfermedades, generando resultados prometedores (Andino, 2017; Ferreira et al., 2017; Gaiero et al., 2018). La idea de un esquema de mejoramiento genético por introgresión es valerse de la resistencia a una enfermedad o alguna otra característica de interés que tenga una accesión específica, e introgresarla a una especie de interés comercial. Los clones que se utilizan por su característica particular se seleccionan mediante diferentes evaluaciones previas para esa característica y luego se cruzan sucesivamente, generando lo que se conoce como clones avanzados, es decir, clones que fueron evaluados muchas veces en cuanto a la nueva característica y a su potencial agronómico (Martin, 1985). Un ejemplo de esto es la introgresión de resistencia a *R. solanacearum* de cmm a tbr, mediante la utilización de especies puente como *S. phureja* (Gonzalez, 2010). Para poder realizarlo de forma exitosa hay que superar las barreras postcigóticas a la hibridación interespecífica (Johnston y Hanneman, 1982) mediante gametos no reducidos, los cromosomas de ambas especies deben de aparearse y recombinarse en el híbrido y las retrocruzas, las secuencias repetidas no deben diverger y los genomas deben ser colineales a nivel cromosómico y de secuencia (Gaiero et al., 2017; 2019b). Estudios realizados por Gaiero et al (2016) de colinealidad evaluada por mapeo citogenético mostraron que todos los grupos de ligamiento de la papa tienen su homólogo en las especies silvestres distribuidas en Uruguay. A su vez, los marcadores citogenéticos se encuentran en el mismo orden y similar posición, no habiendo rearrreglos cromosómicos de gran magnitud (Gaiero et al., 2016). Por tanto, los parientes silvestres de la papa distribuidos en Uruguay son candidatos muy promisorios para el mejoramiento por introgresión.

#### 1.3.2 Colección núcleo

El objetivo principal de una colección núcleo es la conservación y utilización eficiente de los recursos genéticos y su diversidad, en este caso los parientes silvestres de la papa; para ello se conserva un mínimo número de integrantes representativos (Frankel, 1984). Esto a su vez permite su utilización de forma más accesible (Frankel, 1984; Brown, 1995; Van Hintum et al., 2000), su protección y

representación (Castañeda-Alvarez et al., 2015). La colección, caracterización, conservación y uso es muy importante para la producción sustentable de cultivos y la adaptación a los cambios climáticos venideros (Machida-Hirano y Niino, 2017). En el caso de la colección núcleo evaluada en esta tesina, fue creada con el propósito de que no se encontraba representada la variabilidad genética y ambiental de los individuos de la región uruguaya (Gaiero et al., 2019a). Esta colección se compone de genotipos diversos de todo Uruguay y está siendo caracterizada a nivel genético, morfológico y evaluando caracteres de interés para seleccionar los genotipos más promisorios, como la resistencia a la marchitez bacteriana.

Para la construcción de esta colección núcleo se partió de colectas representativas de toda la diversidad de parientes silvestres de la papa encontrados en nuestro país. Se colectaron 161 accesiones de 107 puntos de Uruguay (fig. 4) y posteriormente se caracterizaron genéticamente por marcadores de microsatélites y se determinaron sus niveles de ploidía, también se caracterizaron morfológicamente (Abad-Njers, 2020). La colección núcleo fue construida considerando la variabilidad encontrada en variables genéticas, morfofenológicas, de ploidía y de origen geográfico. Se construyó utilizando el programa CoreHunter-2.0 con una intensidad de 40% (Van Hitum, 1999). A esto se le agregaron otros genotipos colectados previamente que tenían un valor agregado por haber sido utilizados en el programa de mejoramiento genético de INIA y tener mucha información genética y de caracterización y evaluación asociada (CSIC I+D, Gaiero, 2016; Gaiero et al., 2019a). De esta manera se constituyó una colección núcleo que representa la variabilidad de la papa silvestre uruguaya (CSIC I+D, Gaiero, 2016; Gaiero et al., 2019a).



**Figura 4:** Mapa de Uruguay con las zonas donde se colectaron los genotipos pertenecientes a la colección núcleo utilizados en los ensayos. En azul se representan los individuos cmm, en naranja mlm y en amarillo chc.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Evaluar el potencial de especies silvestres tuberosas nativas como recursos genéticos para la introducción de resistencia a la marchitez bacteriana en el cultivo de papa.

### 2.2 Objetivos específicos

- Analizar la variabilidad de la colección núcleo en cuanto a resistencia a la marchitez bacteriana.
- Estudiar la dinámica temporal de la progresión de la enfermedad en los genotipos evaluados.
- Determinar si los genotipos más resistentes son capaces de desarrollar infecciones latentes.
- Agregar valor a la colección núcleo, identificando nuevas fuentes de resistencia que podrán ser recursos genéticos para programas de mejoramiento por introgresión.

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Preparación del material vegetal

Para la ejecución de los ensayos (diciembre 2019-enero 2020 y septiembre 2020-noviembre 2020) se partió de genotipos de papa silvestre pertenecientes a una colección núcleo, colectados previamente alrededor del país (Tabla 1), más otros genotipos utilizados como controles, tanto de susceptibilidad como de resistencia, del programa de mejoramiento de INIA (Tabla 2). En total se estudiaron 45 genotipos en ambos ensayos.

Tabla 1. Genotipos de papa silvestre pertenecientes a la colección núcleo que fueron colectados alrededor del país y posteriormente evaluados para resistencia a la marchitez bacteriana.

<b>Genotipo</b>	<b>Especie</b>	<b>Lugar de colecta</b>
A11P1	mlm	Artigas
A2P3	mlm	Artigas
A3P2	mlm	Artigas
A7P2	mlm	Artigas
P3P1	mlm	Paysandú
R11P1	mlm	Rivera
RN5P2	mlm	Rio Negro
RN7P1	mlm	Rio Negro
S31P1	mlm	Salto
S38P1	mlm	Salto
S43P1	mlm	Salto
SJ1P1	mlm	San José
C14P1	cmm	Colonia
C6P1	cmm	Colonia
C2P2	cmm	Colonia
Ca1P1	cmm	Canelones
C11P1	cmm	Colonia
CL2P1	cmm	Cerro Largo
D2P1	cmm	Durazno
F1P1	cmm	Flores
FI6P1	cmm	Florida
L9P1	cmm	Lavalleja
M1P29	cmm	Maldonado

Mo1P29	cmm	Montevideo
R1P1	cmm	Rivera
R4P1	cmm	Rivera
RN3P1	cmm	Río Negro
SJ3P1	cmm	San José
So1P1	cmm	Soriano
TyT1P1	cmm	Treinta y Tres
TyT6P1	cmm	Treinta y Tres
P1P1	chc	Paysandú
RN9P2	chc	Río Negro
RN7P1	chc	Río Negro

Los genotipos se multiplicaron *in vitro* mediante esquejes en medio de cultivo Murashige-Skoog sólido suplementado con sacarosa (Anexo 7.1). Luego de transcurrido un mes y medio aproximadamente, tiempo durante el cual se desarrolló a estado de plántula, el material vegetal se trasplantó a un medio autotrófico hidropónico. Dicho medio es un sustrato comercial hortícola esteril, Klasmann T53™, al cual se le hicieron riegos periódicos intercalados de agua y el fertilizante Kristalon Yellow 13-40-13 (Yara™) en una concentración de 1.2g/L. Cada genotipo se volvió a multiplicar en medio autotrófico hidropónico luego de un mes, siguiendo el protocolo de Rigato (2001). Para ello se utilizó el fungicida Captan 80% (Agritec™), Kristalon Yellow 13-40-13 (Yara™) y una solución 1.6% de Kelpak-1-5-0 (Agroenfoque™), hormona que favorece el enraizado. El material vegetal se conservó en una cámara de crecimiento con fotoperíodo controlado de 12 hs de luz. Dicho procedimiento se repitió hasta obtener la cantidad de plantas necesarias por genotipo, es decir seis por bloque. Una vez que enraizaron fueron transplantadas a almáciguas de 72 celdas (6 x 12), con un volumen de sustrato de 64 cm<sup>3</sup> en cada celda, para la realización del ensayo.

Luego de una semana de crecimiento en estas condiciones, las plantas fueron aclimatadas en el solarío del Centro Regional Sur (CRS) de Facultad de Agronomía, a 24°C, 65% de humedad relativa y un fotoperíodo de 16 hs de luz / 8 hs de oscuridad durante una semana previo a cada ensayo. Se utilizaron 18 plantas de cada genotipo distribuidas con un diseño experimental de 3 bloques al azar con 6 plantas de cada genotipo por parcela (Anexo 7.3).

**Tabla 2:** Germoplasma del programa de mejoramiento de INIA incluidos como testigos en los ensayos de resistencia a marchitez.

Genotipo	Descripción	Respuesta a la marchitez bacteriana
04.02.3	cmm colectado en Colonia	Resistencia parcial <sup>c</sup>
02.01.4	cmm colectado en Rocha	Resistencia parcial <sup>a</sup>
05.05.2.4	cmm colectado en Canelones a partir de semilla	Susceptible <sup>a</sup>
07.01.7	chc colectado en Salto	Resistencia parcial <sup>c</sup>
11.201.27	BC1 de 07.01.7 x tbr	Resistencia parcial <sup>e</sup>
05.02.6	cmm colectado en Canelones	Susceptible <sup>c</sup>
09.509.6	BC2 de (04.02.3 x phu) x tbr <sup>b,d</sup>	Resistencia parcial <sup>e</sup>
01.02.TA	chc colectado en Colonia	Resistencia parcial <sup>a,c</sup>
04.09.T	chc colectado en Río Negro	Resistencia parcial <sup>a,c</sup>
10.05.8	chc colectado en Salto	Resistencia parcial <sup>c</sup>
10.10.10	mlm colectado en Artigas	-
10.10.30	mlm colectado en Artigas	-
Cruza 148	tbr x <i>S. demissum</i>	Resistencia parcial <sup>f</sup>
Chieftain	tbr cultivar comercial con más área plantada en nuestro país	Susceptible <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Galvan et al., 2007; <sup>b</sup>Gonzalez, 2010; <sup>c</sup>Ferreira, 2012; <sup>d</sup>Andino et al., 2021; <sup>e</sup>Ferreira et al., 2017; <sup>f</sup>Martin, 1979.

### 3.2 Preparación del inóculo

Para la realización del ensayo se utilizó la cepa UY031 de *R. solanacearum* (filotipo IIB, secuevar 1) de alta agresividad en papa (Siri et al., 2011). El inóculo se preparó siguiendo el protocolo de Thurston y Lozano (1968) modificado. La cepa se incubó en medio Phi sólido (Anexo 7.1) durante 72 hs a 28°C (fig. 5) y luego se subcultivó en medio Phi líquido (Anexo 7.1) durante 24 hs a la misma temperatura con agitación. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó el cultivo, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en suero fisiológico estéril, ajustando la suspensión a una densidad óptica (600 nm) de 0,1 lo que equivale a una concentración de 10<sup>8</sup> ufc/ml. Luego se realizó una dilución al décimo de esta suspensión, en suero fisiológico, de forma de generar un inóculo de 10<sup>7</sup> ufc/ml (González et al., 2013). La concentración del inóculo se verificó por recuento en placa en medio Phi sólido.

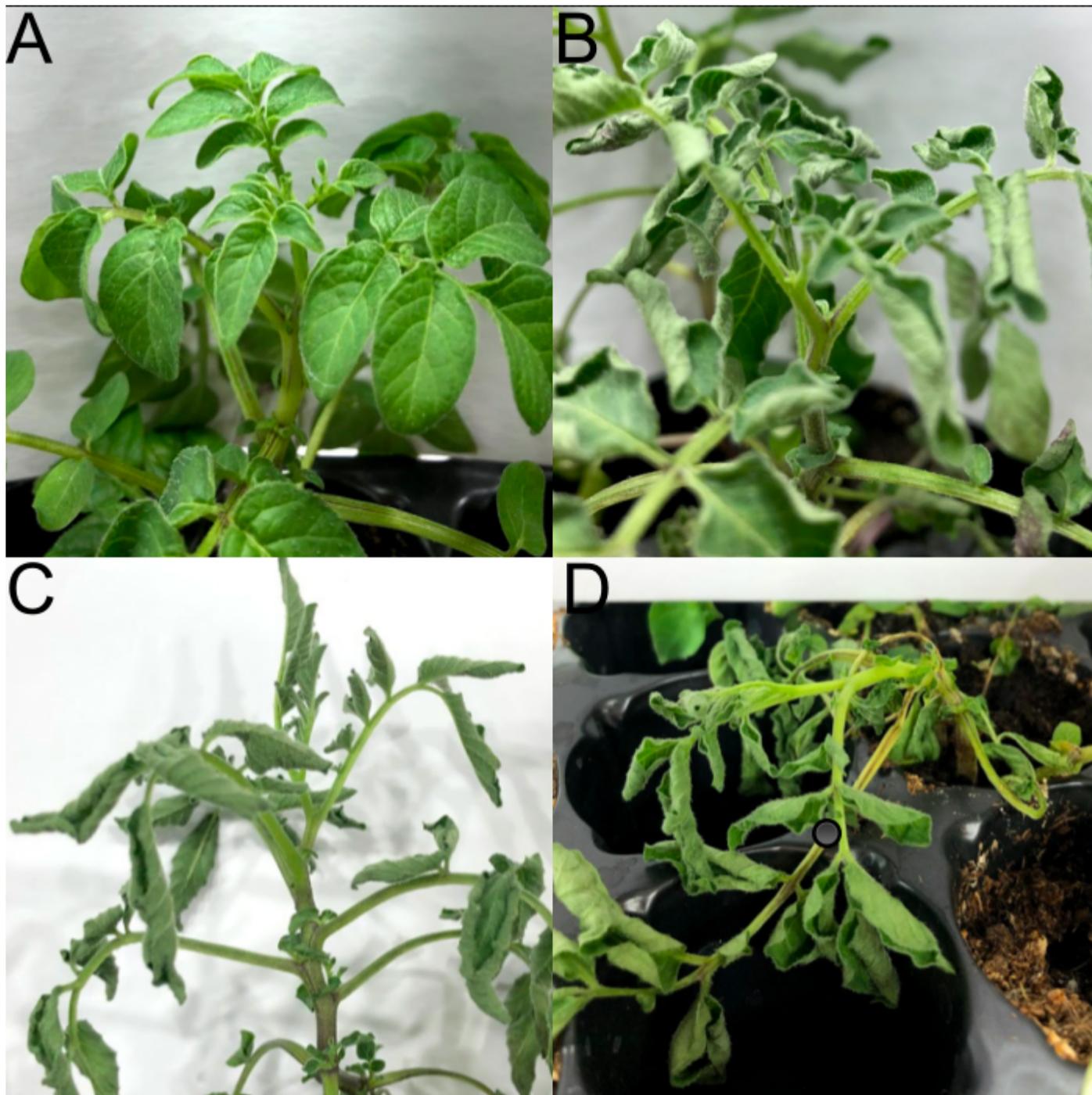


**Figura 5:** Colonias típicas de *Ralstonia solanacearum* crecidas en medio Phi sólido luego de incubación durante 3 días a 28°C.

Cada planta se inoculó con 1 ml de suspensión bacteriana, ocasionando daño de raíz para favorecer la entrada del patógeno a la planta, ya que se aproxima de forma más adecuada a las condiciones de infección natural (Montanelli et al., 1995). Las plantas inoculadas se mantuvieron en el solarío de CRS a 28°C, 65% de humedad y fotoperíodo de 16 hs de luz/8 hs de oscuridad, con la distribución que se observa en el anexo 7.4.

### 3.3 Evaluación de resistencia

La resistencia a la infección bacteriana se evaluó utilizando la escala cualitativa propuesta por Montanelli et al (1995). Esta escala evalúa la sintomatología con valores del 0 al 4, siendo 0 ausencia de la enfermedad, 1 alguna hoja marchita, 2 más de dos hojas presentan la enfermedad, 3 todas las hojas presentan marchitez pero el tallo se mantiene erguido y 4 muerte de la planta (fig. 6).



**Figura 6:** Sintomatología característica de la marchitez bacteriana a nivel foliar y de tallo. **(A)** Enfermedad en estadio 1, **(B)** en 2, **(C)** en 3, **(D)** en 4.

La primera evaluación se realizó a los 10 días post inoculación, ya que es cuando normalmente aparecen los primeros síntomas del marchitamiento bacteriano. Luego de esa primera evaluación, se realizaron evaluaciones periódicas cada 4 días aproximadamente, siendo la última evaluación a los 38 días post inoculación. Se calculó el área bajo la curva de evolución de la enfermedad (AUDPC) para cada genotipo en cada día de la evaluación (Campbell, 1990; Forbes 2014).

### 3.4 Evaluación de latencia

Se determinó la presencia de infecciones latentes en los genotipos con mayor resistencia al marchitamiento. El criterio de selección de los genotipos fue el siguiente: para el primer ensayo, se evaluaron los genotipos que tuvieran más de la mitad de las plantas asintomáticas en dos o más bloques, o que tuvieran todas las plantas asintomáticas en uno de los bloques. Para el segundo ensayo se analizaron los genotipos que tuvieran más de la mitad de las plantas asintomáticas en un bloque.

La latencia se evaluó mediante BIO-multiplex-PCR, siguiendo el protocolo desarrollado por Ferreira et al. (2021). El procedimiento abarca una primera etapa de enriquecimiento en medio selectivo para favorecer

la multiplicación del patógeno, luego de la cual se realiza su detección por amplificación con PCR con cebadores específicos. Para ello, se utilizó un par de cebadores específico para todas las cepas del complejo de especies *R. solanacearum* (759 directo, 760 reverso) (Opina et al., 1997) y otro par de cebadores específico para las cepas pertenecientes al filotipo IIB, secuevar 1-2 (02103 directo y reverso) (Tabla 3).

**Tabla 3:** Cebadores utilizados para la detección de *Ralstonia solanacearum* (cepa UY031) mediante multiplex-PCR

Cebador	Secuencia	Amplicón (pb)
759 (directo)	GTC GCC GTC AAC TCA CTT TCC	280
760 (reverso)	GTC GCC GTC AGC AAT GCG GAA TCG	
02103 (directo)	ATT GCC CAC TAC TTG GAA CG	448
02013 (reverso)	TGG AAT GCA AAC TCA AGC TG	

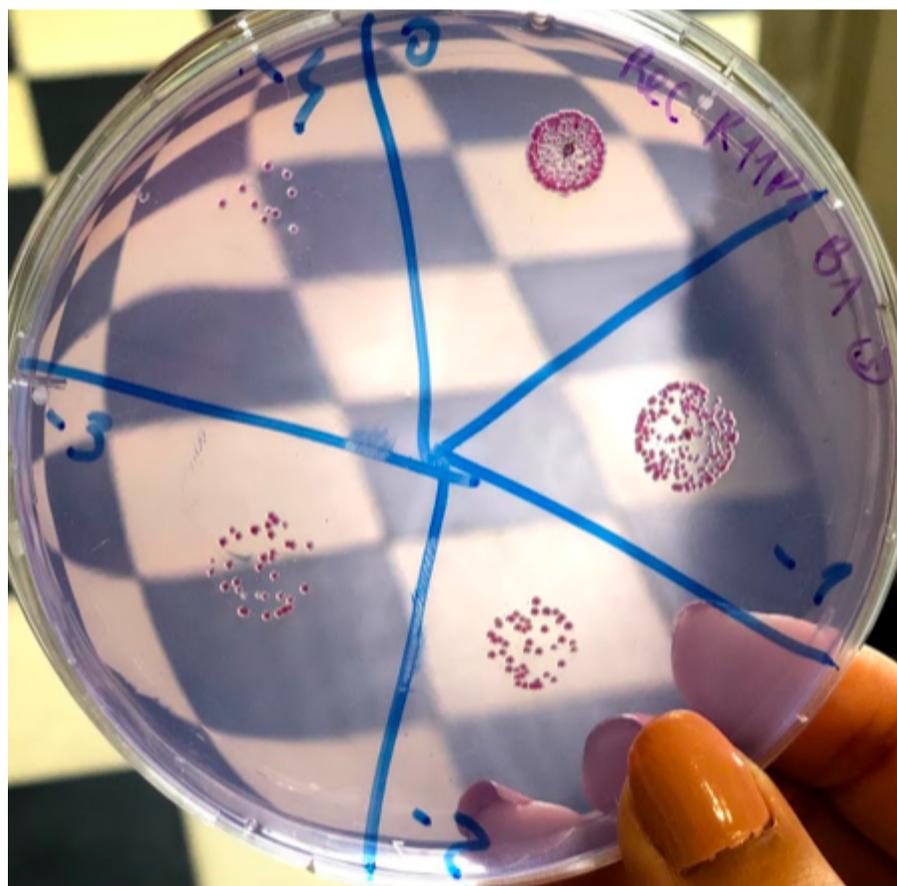
Para el procesamiento de las muestras, se cortaron fragmentos de 2 cm en la zona basal a nivel del tallo de las plantas asintomáticas. Las muestras de un mismo genotipo y bloque se agruparon, se desinfectaron con hipoclorito 1 % durante 1 minuto y se lavaron con agua destilada. Los fragmentos de tallo se suspendieron en 10 ml de buffer de extracción (Anexo 7.2), se machacaron y 100  $\mu$ l de este extracto se sembraron en medio selectivo SMSA (Anexo 7.1), distribuyendo esa alícuota sobre toda la placa (28 °C, 48 h). Transcurrido ese tiempo se lavó cada placa con 2 ml de agua destilada estéril y el lavado se pasó a un tubo donde se realizó la lisis celular por calentamiento a 99 °C durante 20 min. El lisado obtenido se utilizó como molde para la amplificación utilizando una mezcla de reacción detallada en la Tabla 4. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador bajo las siguientes condiciones de amplificación: 5 minutos de incubación a 95 °C, seguida de 40 ciclos de desnaturalización durante 30 segundos a 94 °C y extensión durante 30 segundos a 57 °C. A continuación, se incubó 10 minutos a 72 °C y luego 5 minutos a 20 °C. Cada muestra se amplificó por duplicado y en todas las corridas se incluyó un control positivo (ADN genómico purificado de *R. solanacearum* UY031) y otro negativo (blancos de reacción sin ADN). Los productos de amplificación se observaron por electroforesis en un gel de agarosa 1.5X, utilizando bromuro de etidio como agente intercalante y buffer TBE (Anexo 7.2) para correrlo.

**Tabla 4:** Preparación de las mezclas de reacción de la BIO-multiplex PCR. Volumen final de la reacción 25  $\mu$ l.

Componentes	Concentración final	Volumen ( $\mu$ l)
Buffer	1X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	1.5
dNTPs	0.2 mM	1
Cebador 759 <i>forward</i>	2.5 mM	1
Cebador 760 <i>reverse</i>	2.5 mM	1
Cebador 02103 <i>forward</i>	2.5 mM	1
Cebador 02013 <i>reverse</i>	2.5 mM	1
Taq polimerasa	5 U/ $\mu$ l	0.3
Agua miliQ	-	10.7

Lisado/Control positivo/Control negativo	-	5
--	---	---

Adicionalmente, se cuantificó la concentración del patógeno a nivel del tallo en las plantas asintomáticas mediante recuento en placa en un medio de cultivo selectivo. Para cada genotipo y bloque a evaluar, se tomó una muestra de tallo, se desinfectó superficialmente con hipoclorito y se colocó en un tubo eppendorf. Luego se agregó 1 ml buffer de extracción y se trituró el tejido con un pestel estéril. Para cada muestra se hicieron cuatro diluciones seriadas al décimo con suero fisiológico (0, -1, -2, -3 y -4) y cada una de ellas se sembró mediante microgota (20  $\mu$ l) en placas de SMSA. Las placas se incubaron durante 2 días a 28 °C. Luego se hizo el recuento en placa de la dilución que estaba en un rango contable (fig. 7).



**Figura 7:** Colonias de *Ralstonia solanacearum* crecidas en medio SMSA. Se observa la siembra de diluciones seriadas mediante microgota.

### 3.5 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SAS Studio OnDemand, el script (Anexo 7.4) fue gentilmente cedido por Ing. Agr. Pablo González Barrios. Se empleó un modelo mixto de análisis, utilizando el área bajo la curva de progresión de la enfermedad (AUDPC) como variable dependiente, primero para ambos ensayos juntos y luego por separado. Esto permite calcular los mejores estimadores lineales para cada individuo. Se realizó un test de tipo 3 de efectos fijos para evaluar el efecto del genotipo, especie, momento, bloque, ensayo y sus interacciones. En los casos en los que no se verificó el supuesto de normalidad de los residuos, se transformaron los datos de AUDPC con la función raíz cuadrada. Luego se hizo un ajuste por mínimos cuadrados de AUDPC para cada momento y posteriormente se linealizaron los valores de AUDPC aplicando la función raíz cuadrada para verificar el supuesto de normalidad de los residuos. Con estos resultados se procedió a realizar un ANOVA para calcular las medias ajustadas de AUDPC. y luego aplicar el test HSD de Tukey de comparación de

medias para comparar los genotipos. Además, este test se utilizó para comparar entre momentos.

## 4. Resultados

### 4.1 Evaluación de resistencia a la marchitez bacteriana en una colección núcleo de parientes silvestres de papa y en germoplasma del programa de mejoramiento genético de papa de INIA

Se realizaron dos ensayos de inoculación en años consecutivos para caracterizar la respuesta frente a *R. solanacearum* en el germoplasma disponible. Para ello, se utilizó una cepa de *R. solanacearum* de alta agresividad y un método de inoculación en suelo previamente optimizado y que intenta reproducir las condiciones de infección natural (fig. 8). En la figura 9 se muestra la evolución de los síntomas de marchitamiento para los diferentes genotipos evaluados, tomando como referencia el primer ensayo de inoculación.

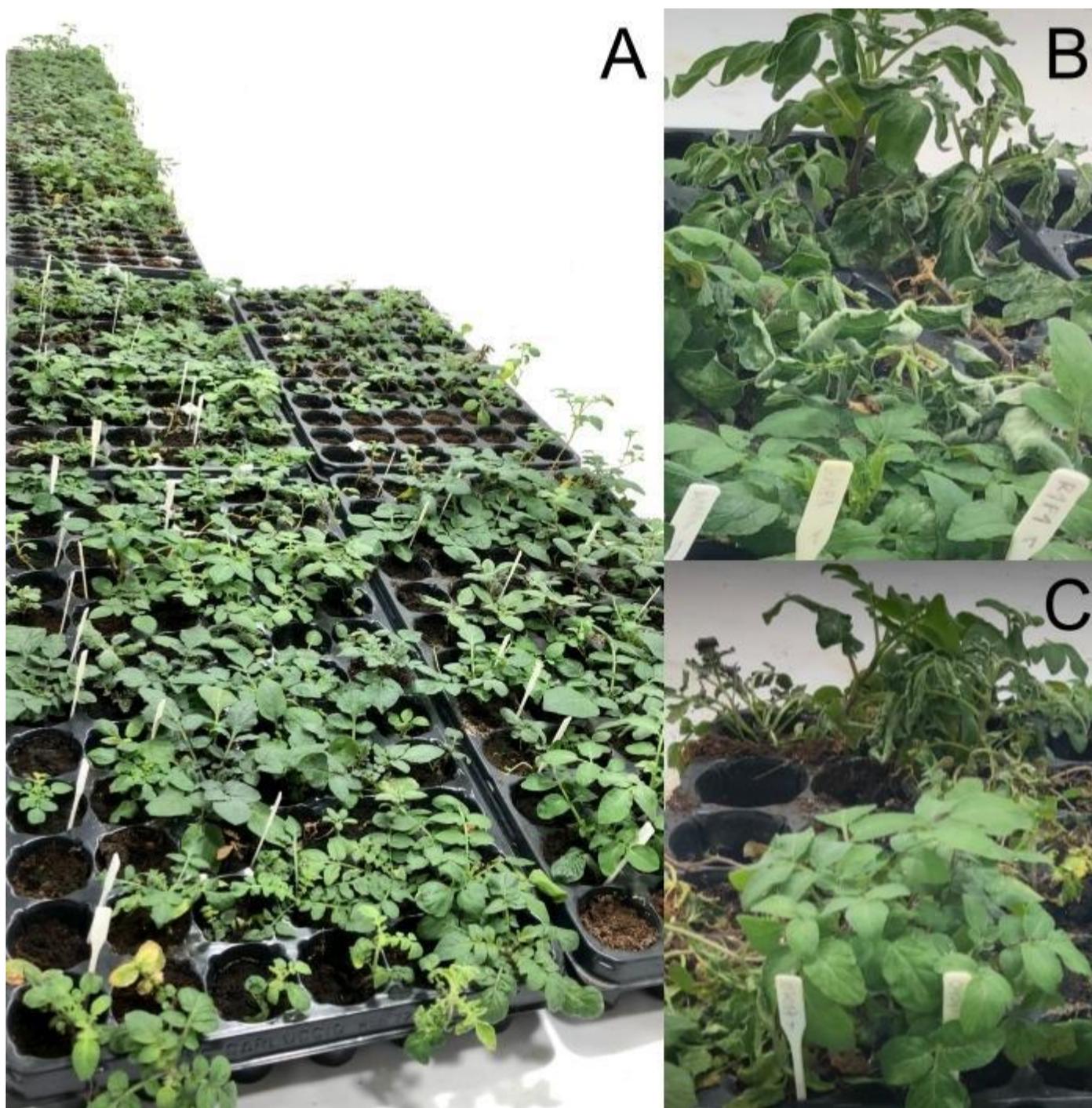


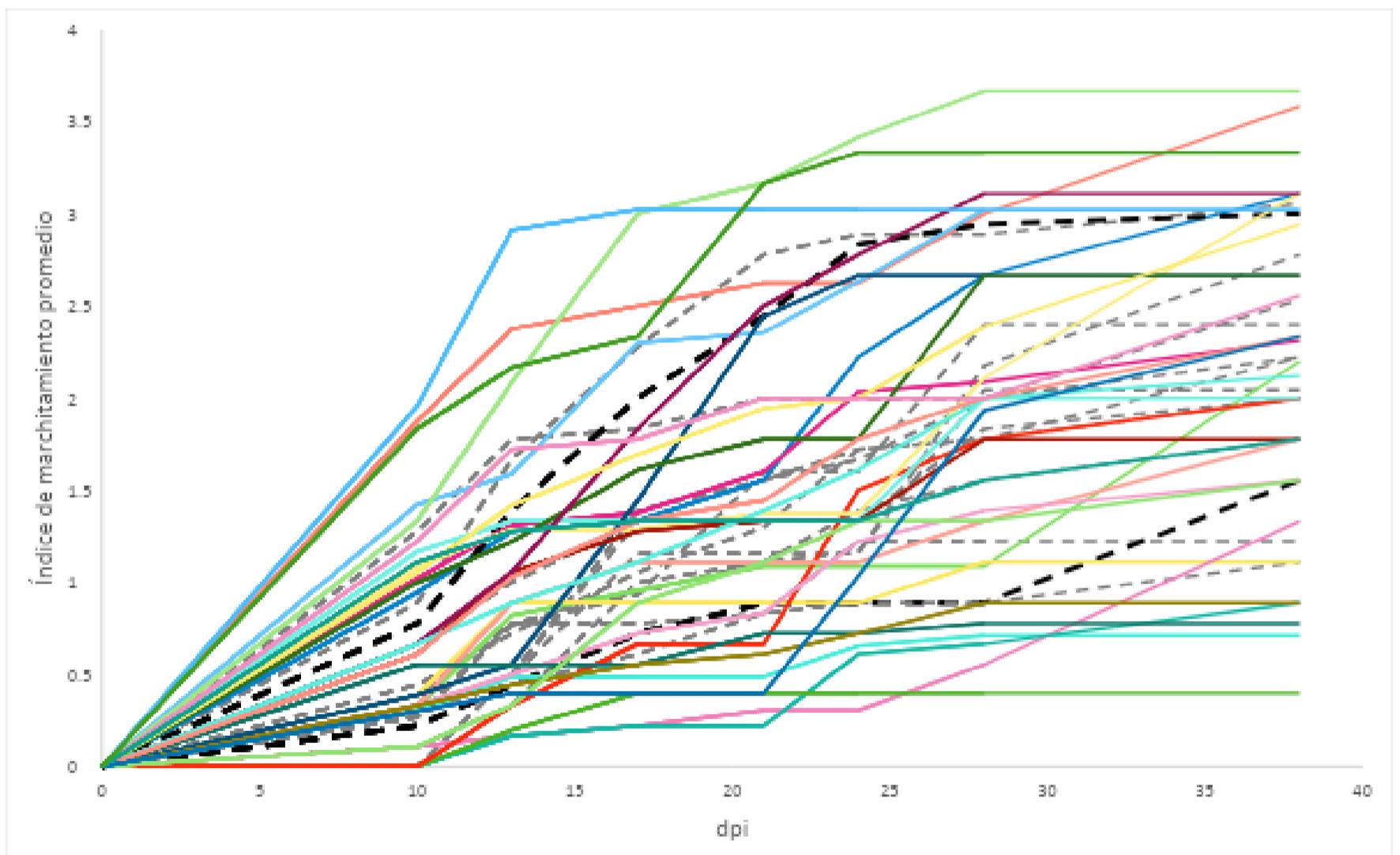
Figura 8: Distribución de las plantas evaluadas en el solarío del CRS previo a la inoculación (A). Evaluación de síntomas a los 21 dpi, se observa como ciertos genotipos desarrollan síntomas y otros no (B y C).

En este ensayo, el control susceptible (cultivar Chieftain) mostró síntomas a partir de la primera evaluación a los 10 días luego de la inoculación, alcanzando un valor de índice de marchitamiento promedio entre todos los bloques de 3 al final del ensayo. Por otro lado, el control resistente 09509.6

mostró un retardo en la aparición de los síntomas y un índice promedio de marchitamiento de 1,5 al final del ensayo, lo que denota una alta proporción de plantas que permanecieron asintomáticas.

En el caso de los individuos de la colección núcleo, se observó un amplio espectro de respuestas frente a la inoculación con *R. solanacearum*. Varios genotipos, como FL6P1, C11P y TyT6P1, mostraron mayores niveles de infección que el control susceptible cv. Chieftain. También se encontraron algunos genotipos con una muy baja aparición de síntomas de marchitamiento, destacándose Ca1P1, A11P1, R11P1, C6P1 y RN3P1. Estos genotipos presentaron un índice de marchitamiento promedio menor a 1 al final del ensayo como resultado de una muy baja proporción de plantas con síntomas. Una respuesta similar fue observada en los genotipos 10.10.10, A7P2 y C14P1, ya que, a pesar de tener un índice de marchitamiento mayor, se comportaron mejor que el control de resistencia 09.509.6.

En el segundo ensayo de inoculación se observaron mayores niveles de infección a nivel general para todos los genotipos evaluados, incluso para los controles con resistencia parcial. Los genotipos silvestres que mostraron un menor progreso de síntomas fueron D2P1, 07.01.7, A11P1, C11P1, R11P1, S31P1, Fl6P1 y TyTP1, los cuales presentaron índices de marchitamiento promedio entre 1,9 – 2,5 al final del ensayo.



**Figura 9.** Gráfico de evolución del índice de marchitamiento promedio por genotipo en función del tiempo para el primer ensayo de inoculación con *Ralstonia solanacearum*. En líneas punteadas negras se muestra el cultivar susceptible Chieftain y el testigo con resistencia parcial 09.509.6. En líneas punteadas grises se indican otros materiales utilizados como control y en líneas continuas coloreadas se muestran los genotipos que integran la colección núcleo de especies de *Solanum* nativas.

A partir de estos datos de progresión de síntomas de marchitamiento se calcularon los valores de AUDPC para cada genotipo, sobre los cuáles se realizaron los análisis estadísticos que se presentan a continuación. En una primera instancia, se analizaron ambos ensayos juntos mediante el uso de un test de tipo 3 de efectos fijos para ver los efectos de las variables y sus interacciones (Tabla 5).

**Tabla 5.** Resultados de los p-valores arrojados del test de tipo 3 de efectos fijos para el análisis estadístico de los dos ensayos de inoculación juntos. Los efectos fijos que se analizaron fueron bloque, ensayo, genotipo, momento, especie, así como sus respectivas interacciones.

<b>Efecto</b>	<b>P-valor</b>
Bloque	0.0130
Ensayo	0.1764
Genotipo	0.0867
Momento	<0.0001
Especie	0.2076
Interacción genotipo-momento	1.0000
Interacción ensayo-genotipo	<0.0001
interacción ensayo-momento	<0.0001
Interacción ensayo-especie	0.0002
interacción ensayo-genotipo-momento	1.0000

Con estos resultados se observan, por un lado, interacciones significativas entre ensayo-genotipo, entre ensayo-especie, y entre ensayo-momento, siendo momento el instante post-inoculación donde se realizó la evaluación de los síntomas. Sin embargo, las interacciones entre genotipo-momento y la interacción triple ensayo-genotipo-momento no fueron significativas. En base a estos resultados, se concluye que no es posible analizar los ensayos en conjunto y se procede a hacerlo por separado (Tabla 6). Al hacer el análisis de cada ensayo en forma individual, se removió el efecto especie debido a que no fue significativo en ninguno de los dos ensayos. En ambos casos se verifica que no hay interacción significativa entre el genotipo y el momento. En cuanto al efecto del genotipo, se encontraron diferencias en ambos ensayos, resultando significativo sólo en el primero.

**Tabla 6.** Resultados de los P-valores arrojados del test de tipo 3 de efectos fijos para el análisis estadístico de los dos ensayos separados. Los efectos fijos que se analizaron fueron bloque, ensayo, genotipo, momento y sus interacciones.

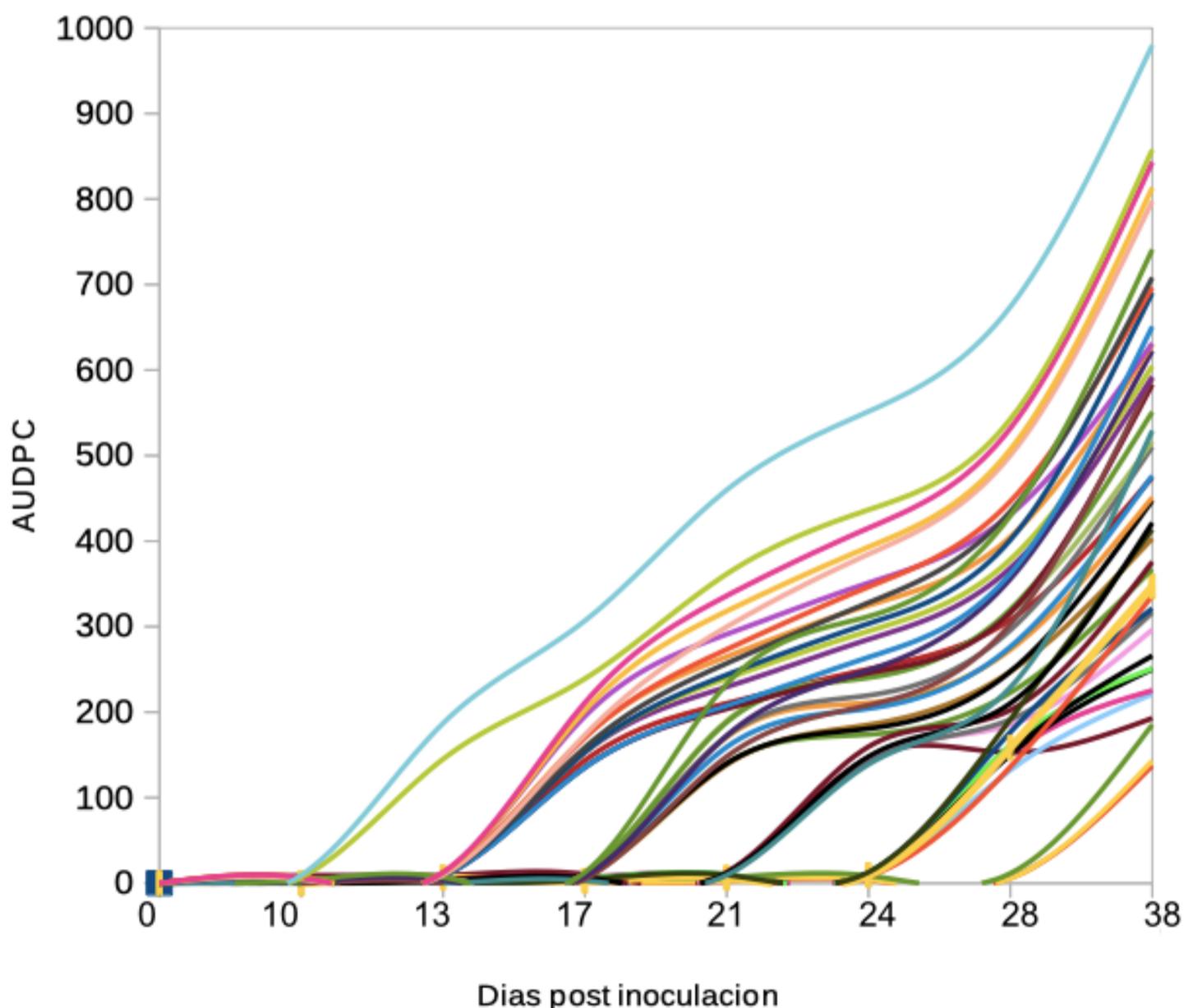
<b>Efecto</b>	<b>P-valor Ensayo 1</b>	<b>P-valor Ensayo 2</b>
Bloque	0.0280	0.0610
Genotipo	0.0230	0.4599
Momento	<0.0001	<0.0001

Interacción genotipo-momento	1.0000	1.0000
------------------------------	--------	--------

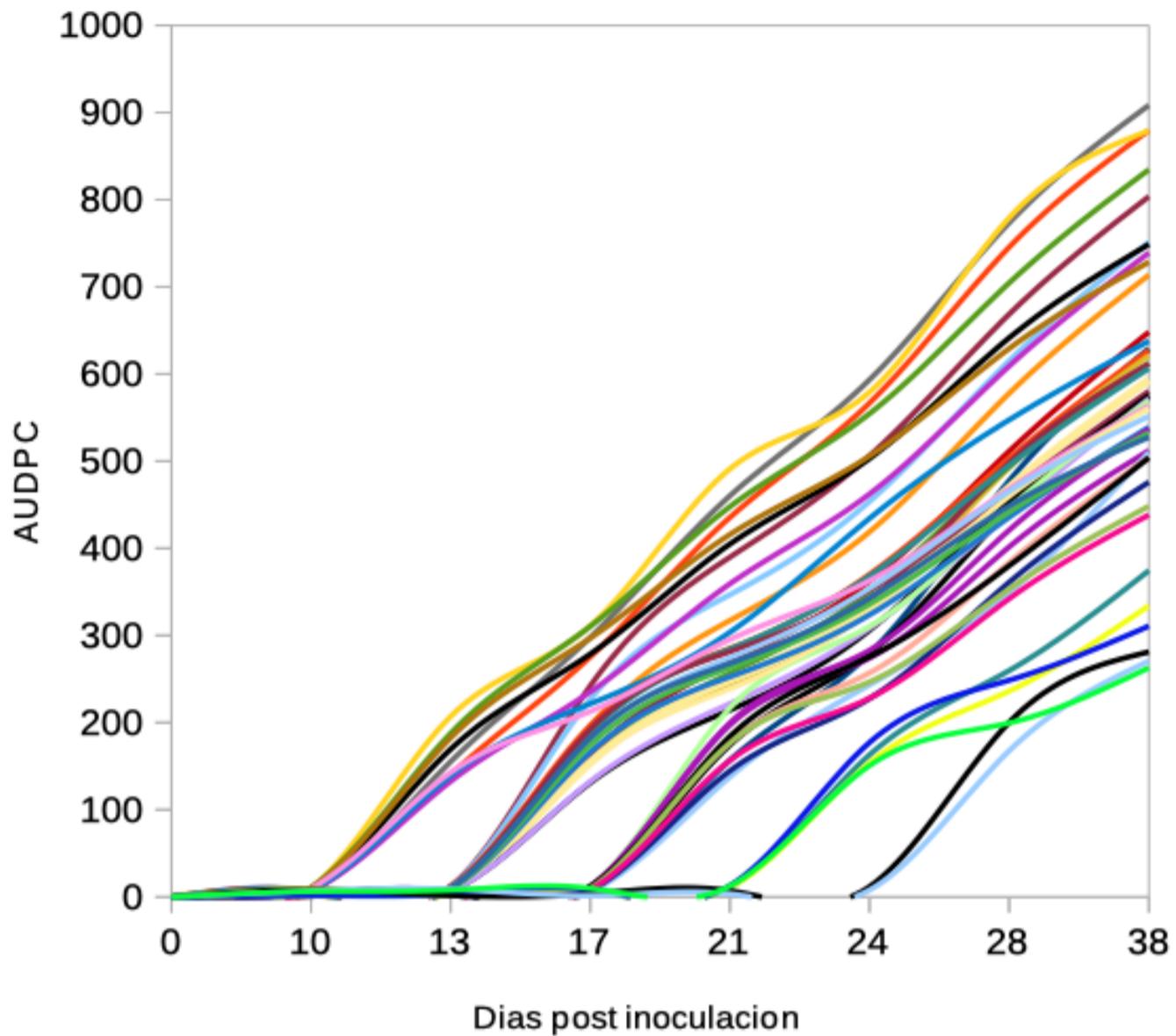
Paralelamente, se hizo un ajuste por mínimos cuadrados de las medias de AUDPC ponderadas. Este ajuste permitió construir gráficos de AUDPC en función del tiempo para cada uno de los genotipos (figs. 10 y 11). En las figuras se puede apreciar que en el primer ensayo sólo hubo dos genotipos con síntomas a los 10 dpi (RN9P2 y C11P1), en comparación con el segundo donde se evidencia una mayor proporción de genotipos con desarrollo de síntomas tempranos. Esto sumado a que los valores de AUDPC en general fueron mayores, sobre todo los de los controles resistentes, nos permite concluir que este ensayo fue más agresivo que el primero.

En los gráficos también se evidencia que no hay interacciones significativas entre genotipo y momento, ya que todas las curvas presentan forma similar una vez que comienzan a registrarse los síntomas. Es decir, la progresión de la enfermedad es bastante similar para la mayoría de los genotipos.

También se observa que en ambos ensayos ningún genotipo fue completamente inmune, es decir, todos en algún momento empezaron a mostrar síntomas de marchitamiento. Sin embargo, en ambos ensayos se destacan algunos genotipos promisorios, que presentaron síntomas muy tardíos y sólo en una baja proporción de plantas inoculadas. En el primer ensayo se destacaron tres genotipos de la colección núcleo, A11P1, C14P1 y C6P1, con valores de AUDPC que aumentan recién a partir de los 28 dpi. En el segundo ensayo el genotipo con mejor comportamiento fue el RN3P1 junto con el clon 09.509.6, utilizado como control de resistencia.



**Figura 10.** Ajuste por mínimos cuadrados de los valores de AUDPC ponderados graficados en función de las evaluaciones periódicas de la enfermedad para el primer ensayo de inoculación.



**Figura 11.** Ajuste por mínimos cuadrados de los valores de AUDPC ponderados graficados en función de las evaluaciones periódicas de la enfermedad para el segundo ensayo de inoculación.

A continuación, se realizó un ANOVA para así calcular las medias ajustadas de AUDPC para cada genotipo contemplando los diferentes momentos (Tablas 7 y 8). Posteriormente se aplicó el test estadístico de Tukey para comparar los genotipos en cuanto a progresión de la enfermedad solamente en el caso del ensayo 1, ya que es donde hay diferencias entre genotipos (Tabla 7). Esto permite así compararlos entre ellos ya que la interacción no es significativa. Los resultados del test de Tukey indican que existen 6 rankings diferentes, es decir, hay 6 categorías con diferencias significativas.

**Tabla 7.** Medias ajustadas de AUDPC para el primer ensayo contemplando momento y genotipo y categoría del test de Tukey para comparar los genotipos. Medias con letra común no son significativamente diferentes. Tukey P-valor>0.05.

<b>Genotipo</b>	<b>Medias ajustadas de AUDPC</b>	<b>Categoría del test de Tukey</b>
RN9P2	30,8	A
C11P1	23,1	AB
FI6P1	20,3	AB
04.09.T	19,4	AB
F1P1	18,2	AB
RN7P1	15,1	ABC
Chieftain	15,1	ABC
SJ3P1	12,9	ABCD
10.05.8	12,8	ABCD
R1P1	12,3	ABCDE
S43P1	11,9	ABCDE
C2P2	10,9	ABCDEF
TYT6P1	9,8	ABCDEF
D2P1	9,4	ABCDEF
P1P1	9,2	ABCDEF
L9P1	9,1	ABCDEF
01.02.TA	8,2	BCDEF
SJ1P1	7,1	BCDEF
TYT1P1	6,9	BCDEF
S31P1	6,1	BCDEF
02.04.1	5,9	BCDEF
RN5P2	5,5	BCDEF
11.201.27	4,9	BCDEF
07.01.7	4,3	BCDEF
05.02.6	4,1	BCDEF
05.05.2	3,7	BCDEF
M1P29	3,7	BCDEF
148	3,7	BCDEF
10.10.30	3,4	BCDEF
A2P3	3,3	BCDEF
So1P1	2,9	BCDEF
04.02.3	2,7	CDEF
A7P2	2,5	CDEF
S38P1	2,3	CDEF
CL2P1	2,1	CDEF
Mo1P29	1,8	CDEF
10.10.10	1,7	DEF
R11P1	1,6	DEF
09.509.6	1,6	DEF

RN3P1	1,3	DEF
A11P1	0,9	EF
C14P1	0,4	F
C6P1	0,3	F
Ca1P1	0,2	F

**Tabla 8.** Medias ajustadas de AUDPC para el segundo ensayo contemplando momento y genotipo.

<b>Genotipo</b>	<b>Medias ajustadas de AUDPC</b>
Ca1P1	32,3
C14P1	32,1
RN7P1	31,0
So1P1	27,3
05.05.2	25,7
11.201.27	24,9
02.04.1	23,2
Chieftain	23,0
04.09.T	21,3
P1P1	19,3
SJ3P1	19,3
Mo1P29	19,1
TYT6P1	18,8
P3P1	17,6
01.02.TA	17,2
M1P29	15,9
C2P2	15,2
A7P2	15,1
CL2P1	14,3
RN3P1	13,6
FI6P1	13,6
C11P1	13,5
148	13,5
10.10.10	12,9
TYT1P1	12,8
L9P1	12,6
F1P1	12,1
A3P2	11,6
C6P1	11,4
R1P1	11,1
09.509.6	11,1
A2P3	11,0
RN5P2	10,4
S38P1	10,3
05.02.6	10,0
S43P1	9,9

10.10.30	9,2
04.02.3	7,8
A11P1	6,9
10.05.8	4,8
SJ1P1	4,3
D2P1	3,3
07.01.7	2,7
S31P1	2,7
R4P1	2,6

Por otro lado, también se calcularon las medias ajustadas de AUDPC para cada momento de evaluación de síntomas y se aplicó el test de Tukey (Tablas 9 y 10), obteniéndose 7 categorías. Esto indica que todas las instancias de evaluación fueron significativamente diferentes entre ellas, tanto para el primer ensayo como para el segundo.

**Tabla 9.** Resultado del test de Tukey que compara a los momentos entre sí para el ensayo 1 y medias ajustadas de AUDPC. Medias con letra común no son significativamente diferentes. Tukey P-valor>0.05.

Momento	Medias ajustadas de AUDPC	Categoría del test de Tukey
10 dpi	0,6	A
13 dpi	1,4	B
17 dpi	3,1	C
21 dpi	5,9	D
24 dpi	8,1	E
28 dpi	12,1	F
38 dpi	23,7	G

**Tabla 10.** Resultado del test de Tukey que compara a los momentos entre si para el ensayo 2 y medias ajustadas de AUDPC. Medias con letra común no son significativamente diferentes. Tukey P-valor>0.05.

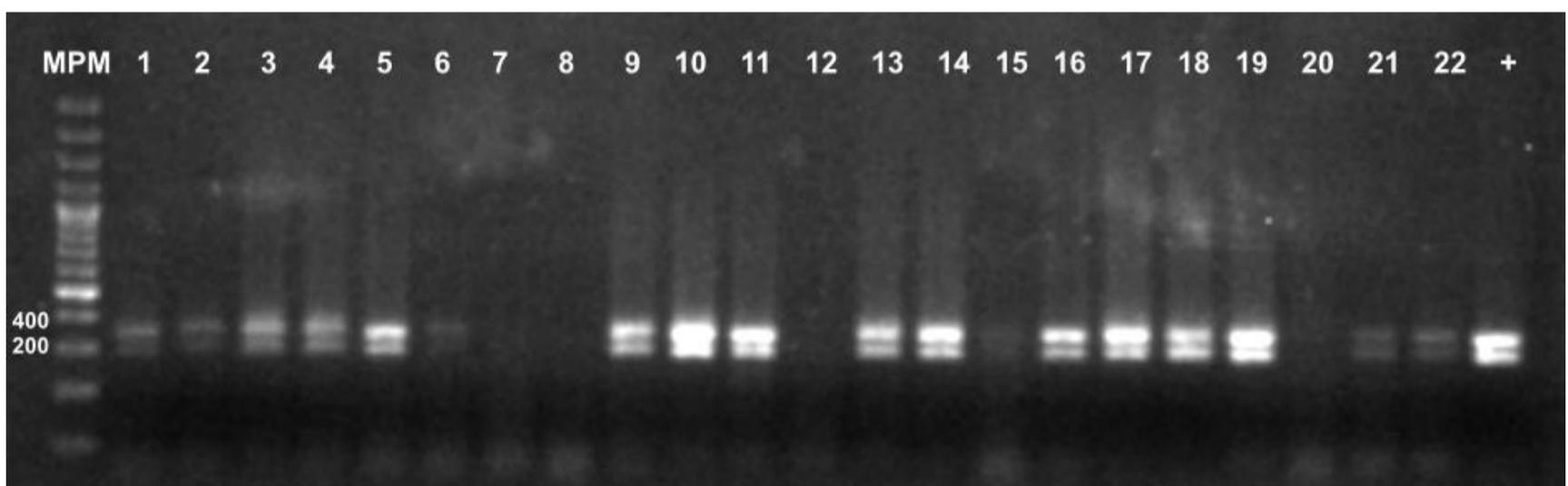
Momento	Medias ajustadas de AUDPC	Categoría del test de Tukey
10 dpi	1,3	A
13 dpi	3,3	B
17 dpi	6,7	C
21 dpi	13,2	D
24 dpi	19,4	E
28 dpi	31,7	F
38 dpi	42,6	G

#### 4.2 Detección de infecciones latentes a nivel de tallo en accesiones asintomáticas

Además del screening de resistencia a la marchitez bacteriana, se detectaron infecciones latentes sobre los genotipos seleccionados como resistentes, mediante BIO-multiplex-PCR. También se realizó recuento en placa en medio selectivo para *R. solanacearum* en las plantas asintomáticas. En el primer ensayo se analizaron 18 genotipos que presentaron al menos dos de los tres bloques con más del 50% de las plantas asintomáticas (Tabla 11). Por otro lado, dado el mayor nivel de infección observado para el segundo ensayo, en este caso fueron analizados sólo 7 genotipos que presentaron más del 50% de plantas asintomáticas en al menos uno de los bloques inoculados (Tabla 12).

A modo general, los resultados obtenidos revelaron la ocurrencia de infecciones latentes a nivel del tallo en varios de los genotipos que permanecieron asintomáticos luego de la inoculación con el patógeno. Por otro lado, este análisis permitió identificar algunos genotipos promisorios que mostraron resistencia al marchitamiento y que no presentaron infecciones latentes en al menos uno de los ensayos realizados.

En la figura 12, se muestra a modo de ejemplo un gel de agarosa con los resultados de amplificación por BIO-multiplex-PCR de algunas de las muestras analizadas. En este caso, se obtuvieron los productos de amplificación de los tamaños esperados para la mayoría de las muestras analizadas, incluyendo un producto de 282 pb conservado para todas las cepas de *R. solanacearum* y otro producto de 321 pb específico para las cepas pertenecientes al filotipo IIB, secuevar 1. En este ejemplo, el genotipo S38P1 (carriles 7 y 8), fue el único que no presentó bandas de amplificación para ninguno de sus duplicados analizados, por lo que se concluye que las plantas no estaban infectadas.



**Figura 12.** BIO-multiplex-PCR para la detección de infecciones latentes a nivel del tallo en plantas que permanecieron asintomáticas luego de la inoculación con *Ralstonia solanacearum*. Fotografía de un gel de agarosa al 1.5%. Muestras: 1y2) TyT6P1 bloque 2, 3y4) TyT1P1 bloque 1, 5y6) 02.04.1 bloque 3, 7y8) S38P1 bloque 2, 9y10) RN3P1 bloque 3, 11y12) M1P29 bloque 3, 13y14) CL2P1 bloque 3, 15y16) Ca1P1 bloque 1, 17y18) 10.05.8 bloque 3, 19y20) 10.05.8 bloque 2, 21y22) C14P1 bloque 3; +: control positivo de amplificación, MPM: marcador de peso molecular de 1kb (Gene Ruler Thermo Scientific™).

Tabla 11. Detección de infecciones latentes en genotipos seleccionados que permanecieron asintomáticos luego de la inoculación con *Ralstonia solanacearum* (ensayo 1). Se muestran los resultados de detección mediante BIO-multiplex-PCR así como la concentración del patógeno a nivel de tallo determinada mediante recuento en microgota en placas con medio SMSA.

Genotipo	Nº de bloques analizados <sup>a</sup>	BIO-multiplex-PCR	Recuento <sup>b</sup> (ufc/g)
----------	---------------------------------------	-------------------	-------------------------------

09.509.6	3	(-)	< 50
A11P1	3	(-)	< 50
C14P1	3	(+/-) <sup>c</sup>	$(4.6 \pm 3.7) \times 10^2$
C6P1	3	(+/-)	< 50
R11P1	3	(+/-)	< 50
01.02.TA	2	(+/-)	$90 \pm 9$
04.02.3	2	(+/-)	< 50
10.10.10	2	(-)	< 50
10.05.8	2	(+)	$(1.6 \pm 1.3) \times 10^5$
A2P3	2	(-)	$(1.8 \pm 1.7) \times 10^2$
A7P2	2	(+/-)	< 50
Ca1P1	2	(+)	$(6.4 \pm 3.7) \times 10^2$
CL2P1	2	(+)	$(1.1 \pm 1.0) \times 10^6$
M1P29	2	(+)	$(1.5 \pm 1.2) \times 10^6$
Mo1P29	2	(+)	$(4.0 \pm 2.4) \times 10^4$
RN3P1	2	(+)	$(1.1 \pm 7.0) \times 10^5$
S38P1	2	(+/-)	$(2.6 \pm 2.4) \times 10^5$
TyT1P1	2	(+)	$(1.3 \pm 1) \times 10^4$

<sup>a</sup> Número de bloques para cada genotipo que presentaron > 50% de plantas asintomáticas al final del ensayo.

<sup>b</sup> Valor promedio con su respectivo error estándar de recuento obtenido para las réplicas analizadas de un mismo genotipo.

<sup>c</sup> Resultado de amplificación variable para las diferentes réplicas analizadas de un mismo genotipo.

A partir de este ensayo se destacan los genotipos 09.509.6 y A11P1, que mostraron buenos niveles de resistencia al marchitamiento y ausencia de infecciones latentes de forma consistente en todos los bloques analizados. El genotipo 10.10.10 también mostró un resultado similar, aunque para dos de los tres bloques de plantas inoculados. Por su parte, los genotipos C6P1, R11P1 y 04.02.3 presentaron resultados variables para la BIO-multiplex-PCR y niveles no detectables de crecimiento mediante recuento en placa, lo que sugiere una nula o muy baja tasa de infección en las plantas analizadas. Por otro lado, en varios genotipos se detectaron infecciones latentes de forma consistente en todas las réplicas analizadas, con niveles de colonización que variaron entre  $10^2$  y  $10^6$  ufc/g de tejido.

Los resultados de latencia obtenidos mediante BIO-multiplex-PCR dieron negativos para la mayoría de los genotipos asintomáticos derivados del segundo ensayo de inoculación (Tabla 12). Se destacan los genotipos A11P1, R1P1, FI6P1, L9P1 y SJ3P1 por presentar además resultados no detectables en el análisis mediante recuento. En los otros genotipos evaluados (07.01.7, D2P1 y SJ3P1), a pesar de resultar negativa la amplificación, se detectaron niveles altos de infección que variaron entre  $10^6$  y  $10^8$

ufc/g de tejido.

**Tabla 12.** Detección de infecciones latentes en genotipos seleccionados que permanecieron asintomáticos luego de la inoculación con *Ralstonia solanacearum* (ensayo 2). Se muestran los resultados de detección mediante BIO-multiplex-PCR así como la concentración del patógeno a nivel de tallo determinada mediante recuento en microgota.

<b>Genotipo</b>	<b>N° bloques analizados<sup>a</sup></b>	<b>Latencia (BIO-multiplex-PCR)</b>	<b>Recuento<sup>b</sup> (ufc/g)</b>
07.01.7	2	(+/-)	$(2.8 \pm 2.7) \times 10^6$
D2P1	2	(-)	$(3.3 \pm 3.2) 10^8$
A11P1	1	(-)	< 50
R1P1	1	(-)	< 50
FI6P1	1	(-)	< 50
L9P1	1	(-)	< 50
SJ3P1	1	(-)	$4.0 \times 10^6$

## 5. Discusión

La marchitez bacteriana es una enfermedad de muy difícil control (Saddler, 2005), ante la cual una de las estrategias que muestran más efectividad es el uso de cultivares resistentes (Huet, 2014). En Uruguay se ha apuntado a explorar nuevas fuentes de resistencia para incorporar a los programas de premejoramiento genético con especies silvestres nativas, particularmente cmm (Gonzalez, 2010; Ferreira, 2019; Andino et al., 2021), ya que esta especie había sido anteriormente evaluada como resistente frente a la enfermedad (Laferriere et al., 1999; Kim-Lee et al. 2004; Galván et al., 2006; Carputo et al., 2009; Siri et al. 2009). Sin embargo, las evaluaciones anteriores fueron realizadas sobre un número relativamente reducido de genotipos silvestres. En este trabajo se evaluaron además otros genotipos representativos de la diversidad de esta y otras especies silvestres y genotipos que forman parte del programa de mejoramiento genético de papa desarrollado por INIA, para poder hacer uso de la gran variabilidad genética de nuestras especies de papas silvestres nativas (Gaiero et al., 2017; Abad-Njers, 2020). A su vez, estas nuevas fuentes de resistencia representan más opciones en la búsqueda de ausencia de latencia de la bacteria en tubérculos asintomáticos.

### *Respuesta diferencial entre genotipos*

Existe una gran variabilidad en la respuesta a la infección por *Ralstonia solanacearum* entre los genotipos evaluados en este trabajo. Ya había sido reportado que la resistencia es una característica variable en cmm (Siri et al. 2009; González et al., 2013) y era esperable que al incorporar en estos ensayos germoplasma de otras especies esa diversidad se viera ampliada. Al analizar estadísticamente ambos ensayos en conjunto, se observan interacciones significativas entre ensayo y genotipo. Que sean significativas implica que los genotipos que están en ambos ensayos se comportan de forma diferente, a su vez, como el p-valor tiende a cero se puede concluir que estas diferencias son pronunciadas. Al concluir el primer ensayo algunos genotipos tuvieron resistencia extrema, permaneciendo asintomáticos, mientras que en otros la marchitez fue completa en todas las plantas de la parcela, tal como observó González (2010) para algunos genotipos de cmm. Sin embargo, para el segundo ensayo encontramos que no hubo efecto genotipo, por lo que todos los genotipos se comportaron del mismo modo. Esto era esperable ya que, para el segundo ensayo, la enfermedad se manifestó de forma más agresiva y menos genotipos sobrevivieron. La resistencia en algunos individuos de esta colección se considera muy alta bajo las condiciones de inoculación exigentes de ambos ensayos. Además, en este trabajo se evidencia la necesidad de realizar tamizados dentro de las especies dada la alta variabilidad encontrada.

La variabilidad en respuesta y en el avance de la marchitez bacteriana en el primer ensayo se evidencia además por las seis categorías con diferencias significativas de AUDPC encontradas en el test de comparación de medias de Tukey. En la categoría de mayor resistencia se encuentran 09.509.6, RN3P1, A11P1, C14P1, C6P1 y Ca1P1 que habían resultado los más resistentes en los demás análisis estadísticos. Los materiales avanzados del programa de premejoramiento en general mostraron consistencia en cuanto a su resistencia en este estudio y con los resultados de estudios anteriores (González et al., 2013; Ferreira et al., 2017; Andino et al., 2021), genotipos como el 09.509.6 es un ejemplo de esto; también el 10.10.10, un ejemplar de mlm utilizado en dicho programa. En el caso de 09.509.6, segunda retrocruza con resistencia que se mantiene en generaciones sucesivas y de características agronómicas deseables, se encontró consistencia no sólo entre los bloques, sino también, en ambos ensayos. Este resultado, confirma caracterizaciones previas en donde se verificó que este genotipo presenta resistencia parcial frente a la inoculación, retardando la aparición de síntomas de marchitamiento y limitando el progreso de la enfermedad (Ferreira et al., 2017). Otros testigos utilizados, como el caso de cruza 148 que es relativamente resistente en diferentes ambientes (Montanelli et al.,

1995), se comportó en ambos ensayos realizados como susceptible. El hecho de encontrar comportamientos consistentes y respuestas variables entre genotipos nos indica que este trabajo fue capaz de poner en evidencia la gran diversidad de esta colección para resistencia a marchitez bacteriana. La siguiente pregunta a discutir es si además la dinámica de respuesta a la enfermedad es también diversa o si se manifiesta de forma similar en todos los genotipos a lo largo del tiempo.

#### *Dinámica de la respuesta a la enfermedad*

Las dinámicas de inicio de la enfermedad fueron diferentes entre ensayos. Se encontraron interacciones significativas entre ensayo y momento. Es muy diferente lo que ocurre, por ejemplo, a los 10 dpi para un ensayo comparado con el otro.

No obstante, el progreso de la enfermedad mantiene una dinámica muy similar para ambos ensayos. Las interacciones entre genotipo y momento no fueron significativas; lo cual indica que los genotipos que tienen un bajo nivel de la enfermedad se mantienen así a lo largo del tiempo, lo mismo aplica para los que tienen un gran nivel de la enfermedad. La interacción triple tampoco fue significativa lo que implica que por más de que la dinámica sea similar, el avance de la enfermedad parte de diferentes puntos (diferentes dpi) para cada ensayo.

Los crecimientos en el avance de la enfermedad son muy similares entre genotipos en el transcurso del tiempo. Al analizar cada ensayo de forma individual, en ambos casos se observa que no existe interacción significativa entre el genotipo y el momento, lo que permite compararlos entre ellos. Ese comportamiento ya había sido observado para algunos genotipos de cmm y de híbridos y retrocruzas del programa de premejoramiento (González, 2010; Ferreira, 2019). Si a su vez se observa el test de Tukey aplicado en las evaluaciones periódicas de la enfermedad, se ve que todos los genotipos se comportan igual tanto al comienzo de la enfermedad (10, 13 dpi), lo cual es consistente ya que al comienzo casi no se observan síntomas, como en el medio de la misma (20, 24 dpi), este comportamiento cambia al final; pues algunos se mantienen en 1 mientras que otros son 4. Independientemente del tiempo hay genotipos que expresaron muchos síntomas y otros que no, consistente con la gran variabilidad en respuesta a la enfermedad encontrada

La marchitez bacteriana es una enfermedad muy destructiva, una vez que empieza es difícil de manejar (Muthoni et al., 2012). En este trabajo se observa para el ensayo uno un comienzo más tardío. Asimismo, en ambos casos se puede observar la variabilidad de respuesta a la enfermedad que hubo en ambos ensayos, ya que hubo genotipos relativamente resistentes y otros muy susceptibles, con niveles de AUDPC muy variables. Los genotipos resistentes lo serían debido a la presencia de defensas primarias como barreras estructurales y altas concentraciones de glicoalcaloides; además de genes de respuesta inducida por el patógeno como los responsables de la respuesta mediada por el ácido salicílico y de especies reactivas del oxígeno (Narancio, 2011).

#### *Nuevas fuentes de resistencia y ausencia de latencia*

Las infecciones latentes de la marchitez bacteriana son un problema muy grande ya que contribuyen a la diseminación de *R. solanacearum* en condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad (Priou et al., 2005). En la evaluación de este tipo de infecciones, se encontró que varios genotipos que parecían promisorios ya que tenían bajos niveles de AUDPC, igualmente estaban cursando la enfermedad, pues tanto la PCR como el recuento en placa, arrojaron resultados positivos. Esto ocurrió por ejemplo en los genotipos M1P29, 01.02.TA, Ca1P1. En estos casos se podría hipotetizar que la planta sobrevive con la bacteria dentro del xilema, es decir, que existe una resistencia parcial (Lebeau et al., 2011). En cuanto a la determinación de infecciones latentes en plantas asintomáticas, es importante

mencionar que en ciertos casos, sucedió que la PCR era positiva pero el recuento en placa no, o viceversa. Esto pudo deberse a que a la hora de preparar las muestras para los recuentos, solo se utilizó un tallo, mientras que para la PCR se extrajo ADN de los cinco tallos restantes. Por lo tanto, quizás ese tallo seleccionado no presentaba infección a ese nivel, pero el resto sí; o viceversa.

Los niveles de infección encontrados en este trabajo (concentraciones de patógeno en tallo entre  $10^5$  y  $10^6$  ufc/g) se diferencian de los reportados en plantas susceptibles con síntomas de marchitamiento que alcanzan concentraciones de hasta  $10^9$  ufc/g (Lowe-Power et al., 2018; Ferreira, 2019). En el caso de los genotipos cuya PCR dio negativa para los tres bloques, tampoco hubo crecimiento de colonias de *R. solanacearum* en las placas de medio de cultivo, lo cual confirma los resultados.

En este trabajo se encontraron nuevas fuentes diversas de resistencia, pertenecientes a distintos grupos de germoplasma (distintas especies). Del screening del primer ensayo, se puede concluir que los genotipos A11P1, A7P2 y RN3P1 (mlm) y los genotipos C6P1, C14P1, R11P1 (cmm) serían resistentes. Respecto a los ensayos de latencia, los genotipos que presentan PCR negativa y no hubo formación de colonias para todos los bloques son A11P1 y 09.509.6. Por lo tanto, estos podrían considerarse con resistencia completa, ya que la planta estaría limitando el acceso de *R. solanacearum* al xilema (Lebeau et al., 2011). En evaluaciones previas realizadas tanto en Uruguay (Ferreira, 2019) como por el Centro Internacional de la Papa (CIP) (Aslam et al., 2019) no se habían encontrado genotipos inmunes. A su vez hubo otros genotipos que presentan estas características, pero solo para alguno de los bloques como 10.10.10 y A7P2, o bien la PCR daba negativa y el recuento positivo (o viceversa): C6P1, R11P1. Otros genotipos se comportaron tolerantes, ya que presentaron poca o nula sintomatología, no obstante, los ensayos de latencia arrojaron resultados positivos (Ca1P1, C14P1, RN3P2). Por último, también se encontraron genotipos susceptibles como S43P1, RN9P2 (mlm); FI6P1, C11P1 (cmm); RN7P1 (chc). Por otro lado, en la mayoría de los genotipos evaluados se verificó la ocurrencia de infecciones latentes, con niveles variables de colonización a nivel de tallo alcanzando un máximo de  $10^6$  ufc/g. Dentro de la gran diversidad observada en esta colección, se puede afirmar que los casos más extremos de resistencia superan todo lo reportado anteriormente para estas especies, inclusive con genotipos que presentan inmunidad evidenciada por ausencia de latencia.

En cuanto al segundo ensayo, hubo una mayor severidad de la enfermedad: todos los genotipos mostraron algún grado de la enfermedad en todos los bloques, no hubo ningún genotipo que fuera resistente en los tres bloques. El genotipo que mostró mayor resistencia fue A11P1, que también tuvo tanto la PCR como el recuento en placa negativo en los ensayos de latencia. Sin embargo, cabe aclarar que estos resultados corresponden al análisis de un solo bloque de plantas inoculadas, ya que los otros dos bloques presentaron más del 50% de plantas con síntomas al final del ensayo por lo que no fueron testeados para latencia. En los genotipos 07.01.7, D2P1 y SJ3P1, en los que se obtuvieron resultados positivos de los recuentos, las concentraciones del patógeno a nivel de tallo variaron entre  $10^6$  y  $10^8$  ufc/g de tejido. Resulta menester mencionar que los ensayos fueron realizados utilizando una concentración de inóculo de  $10^6$  ufc/g, lo cual es bastante alto comparado con lo que podría suceder a campo (Ferreira, 2019). Además, las plantas utilizadas son pequeñas, lo cual las hace más débiles. Por otro lado, también se ocasiona daño mecánico de raíz antes de inocular para favorecer la entrada del patógeno, lo cual no siempre ocurre a campo; al mismo tiempo esto hace que la enfermedad se manifiesta de forma más severa (Subedi et al., 2019). Por todo lo mencionado anteriormente, se puede concluir que la severidad en estos ensayos fue mayor.

Los prometedores resultados obtenidos en este trabajo y en estudios previos, señalan a *S. commersonii* y *S. malmeanum* como algunas de las especies silvestres más prometedoras para el mejoramiento del

cultivo de papa. Dado que Uruguay se encuentra en el centro de origen y diversidad de las especies y que se han establecido colaboraciones con grupos de investigación y programas de mejoramiento de la región, se cuenta con una ventaja comparativa al disponer de la máxima diversidad de estos valiosos recursos genéticos para incorporar resistencia a *R. solanacearum* y otras muchas características deseables para el cultivo.

La colección núcleo ha sido caracterizada y evaluada en trabajos paralelos y otros que aún están en desarrollo, para un mayor conocimiento de su diversidad desde el punto de vista agronómico, fenológico y morfológico, cruzabilidad, contenido de glicoalcaloides y resistencias a otros patógenos. Se dispondrá entonces de una colección núcleo en Uruguay representativa de los recursos genéticos nativos para el mejoramiento de la papa de gran valor estratégico para el país con información descriptiva y una evaluación de su valor de uso para el premejoramiento. Además de la resistencia a *R. solanacearum*, que constituye uno de los objetivos primarios, la incorporación de germoplasma silvestre constituye una estrategia potencialmente muy promisoría para incrementar la adaptación a las condiciones locales en el programa de mejoramiento nacional.

Este trabajo le ha dado un valor agregado a esa colección, ya que el conocimiento de la respuesta de las accesiones colectadas a las principales enfermedades del cultivo es una forma de valorizar el germoplasma. Los materiales promisorios de este trabajo podrían ser seleccionados para realizar ensayos a campo para posteriormente introducirse en el programa de premejoramiento, en donde también podrían evaluarse características de interés agronómico. De esta forma, podrían desarrollarse variedades comerciales resistentes o parcialmente resistentes, que en combinación con otras estrategias de control, permitiría buenas prácticas de manejo de la marchitez bacteriana.

## 6. Conclusiones

Existe variabilidad en la respuesta a la enfermedad producida por *R. solanacearum*, dentro y entre los diferentes genotipos pertenecientes a la colección núcleo que fueron evaluados. Se concluye que hay genotipos tanto muy susceptibles como muy resistentes en poblaciones de cmm y mlm.

En el primer ensayo se encontró que los genotipos A11P1 (mlm) y 09.509.6, serían resistentes en los tres bloques evaluados. No obstante, en el segundo no hubo ningún genotipo resistente en los tres bloques, A11P1 se mantuvo como parcialmente resistente pero 09.509.6 no.

Estos resultados son muy prometedores y permiten que este germoplasma sea introducido al programa de premejoramiento para aprovechar la resistencia encontrada.

## 7. Anexos

### 7.1 Medios de cultivo.

Medio Phi sólido (Kelman, 1954).

Peptonas	10g
Extracto de levadura	1g
Cas-Aminoacidos	1g
Agar	15g
Glucosa 20%	25ml
TTC	5ml
Agua destilada	1L

Medio Phi líquido (Kelman, 1954).

Peptonas	10g
Extracto de levadura	1g
Cas-Aminoacidos	1g
Agua destilada	1L

Medio SMSA (Elphinstone et al., 1996).

Peptonas	10g
Cas-Aminoacidos	1g
Glicerol	5ml
Agar	15g
Polimixina B Sulfato 1%	10ml
Bacitracina A 1%	2.5ml
Penicilina G 0.1%	500ul
Cristal violeta 1%	500ul
Cloranfenicol 1%	500ul
TTC 1%	5ml
Cicloheximida 1%	10ml
Agua destilada	1L

Medio MS.

Solución de nitratos	20ml	KNO <sub>3</sub>	95g
		NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82.5g
		Agua destilada	1000ml
Solución de sulfatos	20ml	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	18.5g
		CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.00125g
		MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.115g
		ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.430g
		Agua destilada	1L
Solución de halógenos	20ml	CaCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	22g
		KI	0.0415g
		CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.00125g
		Agua destilada	1L
Solucion A	20ml	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.5g
		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.310g
		Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.0125g
		Agua destilada	1L
Solucion B	20ml	Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	1.896g
		FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.392g
		Agua destilada	1L
Solución de vitaminas STABA	1ml	Acido folico	50mg
		Biotina	100mg
		Cloro colina	100mg
		Acido pantotenico	100mg
		Tiamina	100mg
		Nicotinamida	200mg
		Piridoxina	200mg
		Acido aminobenzoico	200mg
		Agua destilada	100ml
Myo-inositol	200mg		
Sacarosa	30g		
Agar	8g		
Agua destilada	1L		

## 7.2 Soluciones

Buffer de extracción fosfato 50mM ph=7.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4.26g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.72g
Agua destilada	1L

Buffer TBE 0.5X para electroforesis.

Tris base	108g
Acido borico	55g
EDTA	7.5g
Agua destilada	1L

## 7.3 Diseño experimental en CRS

A

A11P1  
A7P2  
RN5P2  
05.05.2  
09.509.6  
11.201.27

SJ3P1  
10.05.8  
05.02.6  
RN3P1  
148  
C6P1

S38P1  
07.017  
C2P2  
04.09.T  
C14P1  
F1P1

A2P3  
RN7P1  
D2P1  
Mo1P29  
RN9P2  
M1P29

T1T1P1  
S31P1  
SJ1P1  
Ca1P1  
L9P1  
R11P1

P1P1  
10.10.30  
S43P1  
R1P1  
10.10.10  
C11P1

02.04.1  
FL6P1  
01.02TA  
Chieftain  
04.02.3  
CL2P1

B

L9P1	02.04.1	D2P1	04.02.3
R11P1	Chieftain	A2P3	
T1T1P1	01.02.TA	RN7P1	
SJ1P1	FL6P1	Mo1P29	
C11P1	CL2P1	RN9P2	
S31P1	So1P1	TYT6P1	
10.10.10	05.02.6	F1P1	
10.10.30	C6P1	04.09.T	
R1P1	148	C2P2	
S43P1	RN3P1	07.01.7	
P1P1	10.05.8	05.05.2	
C14P1	SJ3P1	11.201.27	
			S38P1
			09.509.6
			RN5P2
			A7P2
			M1P29
			A11P1

C

05.02.6	Mo1P29	04.02.3	CL2P1
So1P1	A2P3	RN3P1	
148	RN7P1	FL6P1	
C6P1	M1P29	10.05.8	
01.02.TA	D2P1	02.04.1	
S31P1	A11P1	Chieftain	
C2P2	TYT1P1	RN9P2	
R1P1	SJ1P1	TYT6P1	
10.10.30	R11P1	05.05.2	
C14P1	Ca1P1	A7P2	
10.10.10	L9P1	RN5P2	
09.509.6	SJ3P1	07.01.7	
			S38P1
			11.201.27
			P1P1
			F1P1
			04.09.T
			S43P1

**Figura 13:** Esquema con la distribución aleatoria de los genotipos en el solarío del CRS para el primer ensayo realizado. **A)** Bloque 1, **B)** bloque 2, **C)** bloque 3. Tanto los genotipos de A como de C estaban más cerca del aire acondicionado.

**A**

C2P2 07.01.7  
 S38P1 04.09.T  
 04.02.3 CL2P1  
 Mo1P29 11.201.27  
 05.05.2.4 05.02.6  
 148 10.10.10  
 P1P1 A11P1  
 10.10.30 SJ1P1  
 TyT1P1 R1P1  
 C14P1 C11P1  
 02.04.1 01.02.TA  
 A7P2 Ca1P1

FI6P1  
 S43P1  
 Chieftain  
 A3P2  
 D2P1  
 10.05.8  
 RN7P1  
 A2P3  
 09.509.6  
 RN5P2  
 TyT6P1  
 S31P1

F1P1  
 L9P1  
 M1P29  
 P3P1  
 RN3P1  
 SJ3P1

**B**

148  
 04.09.T  
 TyT1P1  
 07.01.7  
 Mo1P29  
 R1P1  
 S31P1  
 C6P1  
 F1P1  
 11.201.27  
 P1P1  
 SJ1P1

A11P1  
 C11P1  
 M1P29  
 R4P1  
 RN3P1  
 10.05.8  
 So1P1  
 05.02.6  
 CL2P1  
 Ca1P1  
 10.10.10  
 A2P3

**C**

02.04.1  
 01.02.TA  
 A3P2  
 P3P1  
 10.10.30  
 04.02.3  
 A7P2  
 S43P1  
 05.05.2.4  
 09.509.6  
 C2P2  
 TyT6P1

SJ3P1  
 C14P1  
 RN7P1  
 Chieftain  
 RN5P2  
 D2P1  
 FI6P1  
 L9P1  
 S38P1

**D**

S43P1  
 09.509.6  
 RN5P2  
 C2P2  
 07.01.7  
 F1P1  
 10.05.8  
 10.10.30  
 FI6P1  
 C11P1  
 S31P1  
 R1P1

148  
 A3P2  
 RN3P1  
 So1P1  
 02.04.1  
 R4P1  
 01.02.TA  
 10.10.10  
 L9P1  
 11.201.27  
 04.09.TA  
 05.02.6

A11P1  
 05.05.2.4  
 Chieftain  
 RN7P1  
 A7P2  
 04.02.3  
 P1P1  
 D2P1  
 M1P29  
 Ca1P1  
 S38P1  
 A2P3

C14P1  
 A2P3  
 C14P1  
 SJ3P1  
 CL2P1  
 TyT1P1  
 Mo1P29  
 P3P1  
 SJ1P1  
 TyT6P1

**Figura 14:** Esquema con la distribución aleatoria de los genotipos en el solarío del CRS para el segundo ensayo realizado. **A)** Bloque 1, **B)** bloque 2, **C)** continuación del bloque 2, **D)** bloque 3. **A)** y **B)** Representan una mesada, **C)** y **D)** la otra. Tanto los genotipos de A como de C estaban más cerca del aire acondicionado.

#### 7.4 Script de SAS utilizado para realizar los análisis estadísticos.

```
data papa;
input Ensayo$ Genotipo$ Bloque$ Planta$ Momento$ AUDPC Especie$;
datalines;
run;
```

```
data papa;
set papa;
parcela = CAT(Genotipo,Bloque);
run;
```

```
data papa;
set papa ;
sqrt_AUDPC=sqrt(AUDPC);
run;
```

```
data papa1;
set papa;
if ensayo=1;
run;
```

```
data papa2;
set papa;
if ensayo=2;
run;
```

```
PROC MEANS DATA=papa1 NWAY;
CLASS Genotipo Momento;
VAR AUDPC;
OUTPUT OUT=ckdmeans MEAN=average;
RUN;
```

```
ods graphics on ;
proc glimmix data=papa ;
class Ensayo Genotipo Bloque Planta Momento especie ;
model sqrt_AUDPC = Bloque Genotipo Momento Momento*Genotipo Ensayo Ensayo*Genotipo
Ensayo*Momento Momento*Ensayo*Genotipo especie Ensayo*Especie / ddfm= kenwardroger ;
random Bloque*Genotipo;
lsmeans especie*ensayo / diff adjust=tukey lines adjdfe=row;
run;
```

```
ods graphics off;
```

```
ods graphics on;
```

```
proc glimmix data=papa1 plots=residualpanel ;  
class Ensayo Genotipo Bloque Planta Momento Parcela especie;  
model sqrt_AUDPC = Bloque Genotipo Momento Momento*genotipo especie / ddfm=satterthwaite ;  
random Bloque*genotipo;  
lsmeans genotipo momento/ adjust=tukey lines adjdfe=row;  
run;
```

```
ods graphics on;
```

```
proc glimmix data=papa1 plots=residualpanel ;  
class Ensayo Genotipo Bloque Planta Momento Parcela especie;  
model sqrt_AUDPC = Bloque Genotipo Momento Momento*genotipo / ddfm=kenwardroger ;  
random Bloque*genotipo;  
lsmeans genotipo momento / adjust=tukey lines adjdfe=row ;  
store salida1;  
run;
```

```
proc plm restore=salida1;
```

```
lsmeans genotipo momento / lines;  
run;
```

## 8. Agradecimientos

Quiero agradecerle en esta instancia en primer lugar a mi familia: a mi madre por siempre estar para mí y bancarme todos los malos humores y las caras largas de cansancio, por siempre esperarme con algo rico cuando llego muy tarde a casa (y cuando no también), por apoyarme en los momentos más duros de la carrera, por cuidarme y enseñarme a ser mejor persona. A mi padre por siempre confiar y creer en mí, por hacerme reír hasta las lágrimas y por hacerme madurar. A mis abuelitos por enseñarme desde chiquita lo que es el amor. A la tía Lules y a la tía Martu. A mis primitos Diego, Elisa y Diego. Los amo con todo mi corazón.

Y también a mi segunda familia, mis amigos. A Fabi, Elu, Vale y Sofi, que me acompañan desde hace casi 20 años, son de fierro. A todos los Fans de Camps, sin ustedes esta carrera no hubiera sido ni la décima parte de divertida; Lucas, Amparo, Luna, Julieta, son los bioquímicos más fabulosos que ha dado la bendita FCien. A Juan, por convertirte en mi hermano, por tus ocurrencias, por siempre estar. A Mauro, nos conocimos por accidente y ahora no podría concebir la vida sin tu amistad. A Jessica, por estar desde el primer día facultad enseñándome a ser más compasiva y escuchar todas mis pavadas. Los adoro con el alma.

A Martin, por estar conmigo desde hace casi 7 años y no haber salido corriendo espantado (aunque bueno a veces sí). In such an ugly world something so beautiful. Te amo.

Por otro lado, quiero mencionar a los compañeros del LEDP y del 12, sobre todo a Mariana, Virginia y Sofía por darme una ayuda enorme para realizar este trabajo. A Pablo por ayudarme con toda la parte estadística. Y a mis tutoras María Inés y Paola por haber confiado en mí y apoyarme en esta dura tarea.

También quiero destacar a Marcos, Fer y Hugo, por confiar en mí los proyectos que se vienen a futuro y por tenerme tanta paciencia.

## 9. Bibliografía

- Abad-Njers, G.F. (2020). Caracterización morfológica y molecular de parientes silvestres de papa en Uruguay. Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Montevideo. Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
- Altesor, P., García, Á., Font, E., Rodríguez-Haralambides, A., Vilaró, F., Oesterheld, M., et al. (2014). Glycoalkaloids of wild and cultivated *Solanum*: effects on specialist and generalist insect herbivores. *Journal of chemical ecology*, 40(6), 599-60.
- Álvarez, B., Biosca, E. G., López, M. M. (2010). On the life of *Ralstonia solanacearum*, a destructive bacterial plant pathogen. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, 1, 267-279.
- Akinyi, S. (2020). Diploid Potato Breeding: Ploidy Determination in 2X × 2X *Solanum tuberosum* Dihaploids Crosses by Self-Compatible Donors with Screening and Identification of Snp Markers Associated with *Ralstonia solanacearum* Resistance in the Wild Species *Solanum commersonii*. Tesis de Doctorado. University of Michigan. Michigan, Estados Unidos.
- Andino, M. (2017). Uso de *Solanum commersonii* Dun en el mejoramiento genético de papa para resistencia a *Ralstonia solanacearum*: caracterización de una retrocruza 3. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Andino, M., Gaiero, P., Gonzalez-Barrios, M., Galvan, G., Vilaro, F., Speranza, P. (2021). Potato introgressive Hybridisation Breeding for Bacterial Wilt Resistance Using *Solanum commersonii* Dun. as Donor: Genetic and Agronomic Characterisation of a Backcross 3. *Potato Research*. 1-18.
- Aslam, M. N., Mukhtar, T., Jamil, M., Nafees, M. (2019). Analysis of aubergine germplasm for resistance sources to bacterial wilt incited by *Ralstonia solanacearum*. *Pak. J. Agric. Sci.* 56(1), 119-122.
- Bashir, I., Nicolao, R., Heiden, G. (2021). Wild Potatoes: A Genetic Reservoir for Potato Breeding. In *Wild Germplasm for Genetic Improvement in Crop Plants* (pp. 215-240). Academic Press.
- Bethke, P. C., Halterman, D. A., Jansky, S. (2017). Are we getting better at using wild potato species in light of new tools?. *Crop Science*, 57(3), 1241-1258.
- Bohlmann, H. (1994). The role of thionins in plant protection. *Crit Rev Plant Sci.* 13:1-6.
- Bradshaw, J.E., Bryan, G.J., Ramsay, G. (2006). Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilization in potato breeding. *Potato Research*. 49:49-65.
- Bradshaw, J.E. (2007). Potato-Breeding strategy. Vreugdenhil, D. (ed). *Potato Biology and Biotechnology advances and perspectives*. 157-177. Elsevier. Oxford, UK.
- Bradshaw, J. E., Ramsay, G. (2009). Potato origin and production. *Advances in potato chemistry and technology* (pp. 1-26). Academic Press. UK.
- Bradshaw, J.E. (2009). Potato breeding at the Scottish Plant Breeding Station and the Scottish Crop Research Institute: 1920-2008. *Potato Res.* 52:141-172.
- Bradshaw, J.E. (2010). Potatoes. *Root and tuber crops*. 10:1-52. UK.
- Brown, A.H.D. (1995). The core collection at the crossroads. *Core collections of Plant Genetic Resources*.

- Busse, J., Auling, G. (1988). Polyamine pattern as a chemotaxonomic marker within the Proteobacteria. *System. Appl. Microbio.* 11:1-8.
- Buddenhagen, I., Kelman, A. (1964). Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2:203-230.
- Cai, X. K., Spooner, D. M., & Jansky, S. H. (2011). A test of taxonomic and biogeographic predictivity: Resistance to potato virus Y in wild relatives of the cultivated potato. *Phytopathology*, 101(9), 1074-1080.
- Campbell, C.L., Madden, L.V. (1990). *Introduction to plant disease epidemiology*. New York.
- Campi, L., Sequeira, L., French, E.R. (1980). Latent infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum*. *American Potato Journal.* 57:377-387.
- Cardi, T., D'Ambrosio, E., Consoli, D. (1993). Production of somatic hybrids between frost-tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: characterization of hybrid plants. *Their Appl.* 87:193-200.
- Carputo, D., Barone, A., Cardi, T., et al. (1997). Endosperm balance number manipulation for direct in vivo germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:12013-7.
- Carputo, D., Aversano, R., Barone, A., Di Matteo, A., Iorizzo, M., Sigillo, L., Frusciante, L. (2009). Resistance to *Ralstonia solanacearum* of sexual hybrids between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. *American Journal of Potato Research*, 86(3), 196-202.
- Caruso, P., Palomo, J.L., Bertolini, E., Alvarez, B., et al. (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.
- Casares, I. (2020). Producción vegetal: papa. MGAP. Anuario Estadístico Agropecuario 2020. Uruguay.
- Castañeda-Alvarez, N.P., De Haan, S., Juarez, H., et al. (2015). Ex situ conservation priorities for the wild relatives of potato (*Solanum* L. Section *Petota*). *PLoS One.* 10:1-19.
- Castro, C., Pereira, A., Costa, D., Choer, E., Mentz, L., Augustin, E., Viegas, J., Gomes, C., Campos, A., Pedroso, R., Garrastazu, M., Barbieri, R.L. (2006). Wild potato genetic resources conserved in Southern Brazil: current knowledge and future perspectives. *PAA Solanaceae Conference*. USA.
- Ceballos, G., Álvarez, E., Bolaños, M.M. (2014). Reducción de poblaciones de *Ralstonia solanacearum* raza 2 (Smith) en plátano (*Musa* AAB Simmonds) con aplicación de extractos de *Trichoderma* sp. (*Alexopoulos* y *Mims*) y bacterias antagonistas. *Acta Agronómica*, 63:1-11.[fecha de Consulta 15 de Enero de 2021]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1699/169930903011>
- Cellier, G., Remenant, B., Chiroleu, F., Lefeuvre, P., Prior, P. (2012). Phylogeny and population structure of brown rot-and Moko disease-causing strains of *Ralstonia solanacearum* phylotype II. *Applied and environmental microbiology*, 78(7), 2367-2375.
- Charkowski, A., et al. (2020). *Potato Crop: Its Agricultural, Nutritional and Social Contribution to Humankind*. Campos, H., Ortiz, O. (eds). Springer. 352-388.
- Chen, Y., Lin, Y., Chao, T.C., Wang, J.F., Liu, A.C., Ho, F., Cheng, C.P. (2009). Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogen-activated protein kinase-related

defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. *Physiologia Plantarum*. 136,324-335.

Chen, L., Guo, X., Xie, C., He, L., Cai, X., Tian, L., et al. (2013). Nuclear and cytoplasmic genome components of *Solanum tuberosum* + *S. chacoense* somatic hybrids and three SSR alleles related to bacterial wilt resistance. *Theoretical and applied genetics*, 126(7), 1861-1872.

Ciampi, L., Sequeira, L., French, E. R. (1980). Latent infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum*. *American Potato Journal*, 57(8), 377-386.

CIP (Centro Internacional de la Papa) (2021). Potato: facts and figures. [En línea]. [Consulta: 11 de enero de 2021] Disponible en: <https://cipotato.org/potato/potato-facts-and-figures/>.

Clausen, A.M., Peralta, I.E., Spooner, D.M. (2013). Grupo VIII. Potato. En: Anton A.M, Zuluaga F. (Eds). *Flora Argentina (Flora Vasc. La República Argentina)*. 13:264-289.

De Haan, S., Rodriguez, F. (2016). Potato origin and production. *Advances in potato chemistry and technology*. Elsevier.

Denny, T.P., et al. (1990). Phenotype conversion of *Pseudomonas solanacearum*: its molecular basis and potential function. Hayward, A.C., Hartman, G.L. (eds). *Bacterial wilt: the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. Wallingford, UK:CAB. 137.

Denny, T.P., Hayward, A.C. (2001). *Ralstonia solanacearum*. Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W. (eds). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. St. Paul, MN:APS Press. 151.

Denny, T.P. (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species. *Plant-Associated Bacteria*. Gnanamanickam, S.S. ed. Springer. Dordrecht, Holanda. 573-644.

Dodds, K.S. (1965). The history and relationships of cultivated potatoes. Hutchinson, J.B. (ed). *Essays in crop plant evolution*. 123-141. Cambridge University Press. Cambridge, UK.

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

Elphinstone, J.G. (2005). *Bacterial Wilt: The Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. Allen, C., et al. (eds). American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 9-28.

EPPO (2004). EPPO Standards PM 7/21. Diagnostic protocols for regulated pests: *Ralstonia solanacearum*. *EPPO Bull.* 34:173-178.

Esposito, N., Ovchinnikova, O.G., Barone, A., Zoina, A., et al. (2008). Host and non-host response to bacterial wilt in potato: role of lipopolysaccharide isolated from *Ralstonia solanacearum* and molecular analysis of plant pathogen interaction. *Chem Biodivers*. 5:2662-2675.

Fegan, M., Prior, P. (2005). How complex is the *Ralstonia solanacearum* complex? Allen, C., Prior, P., Hayward, A.C. (eds). *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*. St. Paul, MN:APS Press. 449.

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

Ferreira, V., Pianzola, M.J., Vilaro, F., et al. (2017). Interspecific potato breeding lines display differential colonization patterns and induced defense responses after *Ralstonia solanacearum* infection. *Front. Plant*

Sci. 8:1-14.

Ferreira, V. (2019). Estudio de la interacción entre *Ralstonia solanacearum* y *Solanum comersonii*. Tesis de Doctorado en Química. Facultad de Química, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Ferreira, V., Gonzalez, M., Pianzzola, M.J., et al. (2021). Molecular Detection of *Ralstonia solanacearum* to Facilitate Breeding for Resistance to Bacterial Wilt in David Dobrik et al. (eds.), *Solanum tuberosum: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology.

Feys, B.J., Parker, J.E. (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics*. 16:449-455.

Flora del Cono Sur. Catálogo de las plantas vasculares. Instituto de Botanica Darwinion. CONICET. Buenos Aires, Argentina.

Fock, I., Collonnier, C., et al. (2000). Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Sci*. 160:165-176.

Fock, I., Collonnier, C., et al. (2001). Use of *Solanum stenotomum* for introduction of resistance to bacterial wilt in somatic hybrids of potato. *Plant Physiol. Biochem*. 39:899-908.

Forbes, G. A., Pérez, W., Andrade-Piedra, J. (2014). Evaluación de la resistencia en genotipos de papa a *Phytophthora infestans* bajo condiciones de campo: Guía para colaboradores internacionales. CIP.

Frankel, O.H. (1984). Genetic perspectives of germplasm conservation. En: *Genetic manipulation: impact on man and society*. Arber, W.K., Llimensee, K., Peacock, W.J., Starlinger, P. (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, UK. Pp. 161-170.

French, E. R. (1972). Progress and problems in selecting resistance to bacterial wilt. En: *Prospects for the potato in the developing world*. French, E. R. (Eds.) CIP, Lima, Peru.

French, E.R. (1986). Interaction between strains of *Pseudomonas solanacearum*, its hosts and the environment. *Proc. Int. Workshop, PCARRD, Philippines*.

French, E.R. (1988). Field evaluation of clones bred for resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Report of the planning conference on bacterial diseases of the potato.

Friedman, M., McDonald, G. M., Filadelfi-Keszi, M. (1997). Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 16(1), 55-132.

Gaiero, P., Van De Belt, J., Vilaró, F., Schranz, M. E., Speranza, P., de Jong, H. (2016). Collinearity between potato (*Solanum tuberosum* L.) and wild relatives assessed by comparative cytogenetic mapping. *Genome*, 60(3), 228-240.

Gaiero, P., Mazzella, C., Vilaró, F., Speranza, P., de Jong, H. (2017). Pairing analysis and in situ hybridisation reveal autopolyploid-like behaviour in *Solanum commersonii* × *S. tuberosum* (potato) interspecific hybrids. *Euphytica*, 213(7), 1-15.

Gaiero, P., Speranza, P., de Jong, H. (2018). Introgressive hybridization in potato revealed by novel cytogenetic and genomic technologies. *Am. J. Potato*. 95:607-621.

Gaiero, P., Andino, M., Vaio, M., Vidal, R., Abad-Njers, G., Amarillo, A., Silva, S., Hernandez, N., Ramos, S., Stancov, V., Moreira, L., et al. (2019a). Identificación de grupos genéticos y distribución de la variabilidad de papas silvestres para su conservación en colecciones núcleo y uso en mejoramiento

- genético. Poster presentado en: Jornada de Mejoramiento Genético de Hortalizas. INIA. Salto, Uruguay.
- Gaiero, P., Vaio, M., Peters, S. A., Schranz, M. E., de Jong, H., Speranza, P. R. (2019b). Comparative analysis of repetitive sequences among species from the potato and the tomato clades. *Annals of botany*, 123(3), 521-532.
- Galvan, G., Fraguas, F., Quirici, L., Santos, C., Silvera, E., Siri, M.I., Villanueva, P., Rauduviniche, L., Gonzalez, M., Torres, D., Castillo, A., Dalla Rizza, M., et al. (2007). *Solanum commersonii*: Una especie con gran potencial para el mejoramiento genético de papa por resistencia a *Ralstonia solanacearum*. *Avances de Investigación en Recursos Genéticos en el Cono Sur II. PROCISUR, REGENESUR*. Montevideo, Uruguay. 87-101.
- Garcia, S. (1976). Status of potato brown rot in Uruguay. En: Proc 1st Int Planning Conf and Workshop on the Ecology and control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Sequeira, L., Kelman, A. (Eds). Universidad Estatal de Carolina del Norte, Raleigh.
- Genin, S., Boucher, C. (2004). Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol*. 42:107-134.
- Genin, S. (2010). Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist* 187: 920–928.
- Gonzalez, M. (2010). Análisis de la resistencia a *Ralstonia solanacearum* en una progenie de *Solanum commersonii*. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.
- Gonzalez, M., Galvan, G., Siri, M.I., et al. (2013). Resistencia a la marchitez bacteriana de la papa en *Solanum commersonii*. *Agrociencia Uruguay*. 7:45-54.
- Goszczyńska, T., Serfontein, J.J., Serfontein, S. (2000). Introduction to practical phyto bacteriology. Safrinet Pretoria. South Africa.
- Govindakrishan, P.M., Haverkort, A.J. (2006). Storage. Gopal, S.M., Khurana, P. (eds). Handbook of potato production, improvement and postharvest management. 489-522. Food Products Press. New York, USA.
- Graham, J., Jones, D.A., Lloyd, A.B. (1979). Survival of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in debris and latency infected potato tubers. *Phytopathology*. 69:1100-3.
- Grey, B.E., 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.
- Habe, I., Miyatake, K., Nunome, T., Yamasaki, M., y Hayashi, T. (2019). QTL analysis of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in potato. *Breeding science*, 69(4), 592-600.
- Hanneman. R.E. (1989). The Potato germplasm resource. *Am Potato J*. 66:655-667.
- Harris, D. (1976). Bacterial wilt in Kenya with particular references to potato. En: Proc 1st Int Planning Conf and Workshop on the Ecology and control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Sequeira, L., Kelman, A. (Eds). Universidad Estatal de Carolina del Norte, Raleigh.
- Hawkes, J.G. (1990). The potato: evolution diversity and genetic resources. Belhaven Press, London.
- Hawkes, J. G. (1994). Origins of Cultivated Potatoes and Species Relationships. In: J. E. Bradshaw, G. R.

- Mackay (Eds.), Potato Genetics (pp. 3–42). CAB International, Wallingford.
- Hayward, A.C. (1964). Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 22:265-77.
- Hayward, A.C. (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:65-87.
- Hayward, A. C. (1994). The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*., 9-24.
- He, L.Y., Sequeira, L., Kelman, A. (1983). Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Dis.* 67:1357-61.
- Huet, G. (2014). Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in plant science*, 5, 715.
- INIA (2017) Catalogo de cultivares hortícolas.
- Jansky, S.H. (2006) Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breed.* 125:1-12.
- Jansky, S. H., Peloquin, S. J. (2006). Advantages of wild diploid *Solanum* species over cultivated diploid relatives in potato breeding programs. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53(4), 669-674.
- Johnston, S.A., Hanneman, R.E. (1982). Manipulations of endosperm balance number overcome crossing barriers between diploid *Solanum* species. *Science.* 217:446-8.
- Kang, Y., Liu, H., Genin, S., et al. (2002). *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol Microbiol.* 46:427-437.
- Kelman, A. (1954). The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. *Phytopathology.* 44:693-695.
- Kim-Lee, H., Moon, J.S., Hong, Y.J., et al. (2005). Bacterial wilt resistance in the progenies of the fusion hybrids between haploid of potato and *Solanum commersonii*. *Am. J. Potato Res.* 82:129-137.
- Laferriere, L.T., Helgeson, J.P., Allen, C. (1999). Fertile *Solanum tuberosum* + *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theor. Appl. Genet.* 98:1272-8.
- Lebau, A., Daunay, M. C., Frary, A., Palloix, A., Wang, J. F., Dintinger, J., et al. (2011). Bacterial wilt resistance in tomato, pepper, and eggplant: genetic resources respond to diverse strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Phytopathology.* 101:154-165.
- Leisner, C. P., Hamilton, J. P., Crisovan, E., Manrique-Carpintero, N. C., Marand, A. P., Newton, L., et al. (2018). Genome sequence of M6, a diploid inbred clone of the high-glycoalkaloid-producing tuber-bearing potato species *Solanum chacoense*, reveals residual heterozygosity. *The Plant Journal*, 94(3), 562-570
- Liu, H., Kang, Y., Genin, S., et al. (2001). Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology.* 147:3215-3229.
- Liu, Y., Kanda, Y., Yano, K., et al. (2009). Molecular typing of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum* in relation to the ability to induce a hypersensitive reaction in tobacco. *J Gen Plant Pathol.* 75:369-380.
- Lopes, C. A., Rossato, M., & Boiteux, L. S. (2015). The host status of coffee (*Coffea arabica*) to *Ralstonia solanacearum* phylotype I isolates. *Tropical Plant Pathology*, 40(1), 1-4.
- Lowe-Power, T. M., Khokhani, D., & Allen, C. (2018). How *Ralstonia solanacearum* exploits and thrives in

the flowing plant xylem environment. Trends in microbiology, 26(11), 929-942.

Machida-Hirano, R. (2015). Diversity of potato genetic resources. Breeding Science. 65:26-40.

Machida-Hirano, R., Niino, T. (2017). Potato genetic resources. The Potato Genome, Compendium of Plant Genomes. 2:11-30.

Mandujano Sanchez, M.C. (2007). La clonalidad y sus efectos en la biología de poblaciones. En: Ecología Molecular. Eguiarte, L.E., Souza, V., Aguirre, X. (Eds.) Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Autónoma de México, D.F., México.

Martin, C. (1979). Sources of resistance to *Pseudomonas solanacearum*. Developments in control of potato bacterial diseases. CIP, Peru.

Martin, C., French, E.R., Nydegger, U. (1982). Strains of *Pseudomonas solanacearum* affecting Solanaceae in the Americas. Plant Dis. 66:458-60.

Martin, C., French, R. (1985). Bacterial wilt of potato *Ralstonia solanacearum*. Technical information Bulletin CIP. 13:2-97.

MGAP (2020). Encuesta de papa "Primavera 2020". Bianchi, M. (eds). Estadísticas agropecuarias.

Micheletto, S., Boland, R., Huarte, M. (2000). Argentinian wild diploid *Solanum* species as sources of quantitative late blight resistance. Theor. Appl. Genet. 101:902-6.

Milling, A., Babujee, L., & Allen, C. (2011). *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants. Plos one, 6(1).

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

Morton, C. (1976). A revision of the Argentine species of *Solanum*. Academia Nacional de Ciencias. Cordoba, Argentina.

Muthoni, J., Shimelis, H., Melis, R. (2012). Management of Bacterial Wilt [*Ralstonia solanacearum* Yabuuchi et al., 1995] of Potatoes: Opportunity for Host Resistance in Kenya. Journal of Agricultural Science, 4(9).

Narancio, R. (2011). Análisis de expresión de la resistencia de *Solanum commersonii* frente al patógeno *Ralstonia solanacearum*. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Narancio, R., Zorrilla, P., Robello, C., Gonzalez, M., Vilaró, et al. (2013). Insights on gene expression response of a characterized resistant genotype of *Solanum commersonii* Dun. against *Ralstonia solanacearum*. European journal of plant pathology, 136(4), 823-835.

Nicolao, R. (2021). *Solanum malmeanum*, a promising wild relative for potato breeding. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Facultad de Agronomía, Universidad Federal de Pelotas. Pelotas, Brasil.

Nion, Y. A., y Toyota, K. (2015). Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. Microbes and environments.

Nyangeri, J.B., Gathuru, E.M., Mukunya, D.M. (1984). Effect of latent infection on the spread of bacterial wilt of potatoes in Kenya. Trop. Pest Manage. 30:163-65.

- Opina, N., Tavner, F., Hollway, G., Wang, J.F., Li, T.H., et al. (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.
- Olsson, L. (1976). Overwintering of *Pseudomonas solanacearum* in Sweden. En: Proc 1st Int Planning Conf and Workshop on the Ecology and control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Sequeira, L., Kelman, A. (Eds). Universidad Estatal de Carolina del Norte, Raleigh.
- Palta, J.P., Chen, H., Li, P.H. (1981). Relationship between heat and frost resistance of tuber bearing *Solanum* species. *Botanical Gazette.* 141:311-315.
- Patil, U.V., Gopal, J., Singh, B.P. (2012). Improvement for bacterial wilt resistance in potato by conventional and biotechnological approaches. *Agric Res.* 1(4):299-316.
- Peeters, N., Guidot, A., Vaillau, F., Valls, M. (2013). *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Molecular plant pathology*, 14(7), 651-662.
- Pianzola, M.J., Zarantonelli, L., Gonzalez, G., et al. (2005). Genetic, phytochemical and biochemical analysis as tools for biodiversity evaluation of wild accessions of *Solanum commersonii*. *Biochem. Sist. Ecol.* 33:67-78.
- Pradhanang, P.M., Elphinstone, J.G., et al. (2000). Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal. *Plant Pathol.* 49:403-413.
- Prieto, A., Ispinzua, V.N., Clausen, A.M. (2016). Distribución y variabilidad morfológica de poblaciones de *Solanum commersonii* (Solanaceae) en la región pampeana de la Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica.* 51:59-71.
- Priou, S., Aley, P., Gutarra, L. (2005). Assessment of resistance to bacterial wilt in CIP advanced potato clones. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* complex. Allen, C., Prior, P., Hayward, A.C. (eds). APS Press, St. Paul, MN. 261-267.
- Proyecto CSIC I+D. (2016). Identificación de grupos genéticos y distribución de la variabilidad de papas silvestres para su conservación en colecciones núcleo y uso en mejoramiento genético. Responsable: Gaiero, P.
- Rigato, S., González, A., Huarte, M. (2001). Producción de plántulas de papa a partir de técnicas combinadas de micropropagación e hidroponía para la obtención de semilla prebásica. *Revista Latinoamericana de la papa*, 12(1), 110-12
- Rowe, P.R., Sequeira, L. (1970). Inheritance of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in *Solanum phureja*. *Phytopathology.* 60:1499-1501.
- Saddler, G.S. (2005). Management of bacterial wilt disease. Allen, C., Prior, P., Hayward, A.C. (eds). Bacterial wilt: The disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. American Phytopathological Society. St Paul, MN.
- Schell, M.A. (2000). Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu Rev Phytopathol.* 38:263-292.
- Sequeira, L. (1979). Development of resistance to bacterial wilt derived from *Solanum phureja*. *Developments in control of potato bacterial diseases.* CIP, Peru.
- Shah, N., Wakabayashi, T., Kawamura, Y., et al. (2020). Extreme genetic signatures of local adaptation

during *Lotus japonicus* colonization of Japan. *Nat. Commun.* 11:1-15.

Simmonds, N.W. (1995). Potatoes. Smartt, J., Simmonds, N.W. (eds). *Evolution of crop plants*. 2ed. Longman Scientific and Technical. Harlow. 466-471.

Singh, D., Yadav, D. K., Sinha, S., & Choudhary, G. (2014). Effect of temperature, cultivars, injury of root and inoculum load of *Ralstonia solanacearum* to cause bacterial wilt of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(13), 1574-1583.

Siri, M.I. (2005). Estudio del sistema *Solanum commersonii* - *Ralstonia solanacearum* enfocado a la búsqueda de factores de resistencia. Tesis de Maestría. Facultad de Química, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Siri, M.I., Galvan, G., Quirici, L., et al. (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 Doctor en Química. Facultad de Química, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

Siri, M.I., Pianzola M.J. (2011). Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. *Plant Disease*. 95:136-143.

Smith, I. M., McNamara D. G., et al. (1992). *Quarantine pests of Europe*. Cambridge, CUVE. CAB International; European and Mediterranean Plant Protection Organization.

Spooner, D. M., Hijmans, R. J. (2001). Potato systematics and germplasm collecting, 1989–2000. *Amer. J. Potato Res.*, 78, 237–268.

Spooner, D.M., McLean K., Ramsay G., Waugh R., Bryan G. J. (2005). A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 14694–14699.

Spooner, D.M., Salas, A. (2006). Structure, biosystematics and genetic resources. Gopal, S.M., Khurana, P. (eds). *Handbook of potato production, improvement and postharvest management*. 1-39. Food Products Press. New York, USA.

Spooner, D. M., Jansky, S. H., & Simon, R. (2009). Tests of taxonomic and biogeographic predictivity: resistance to disease and insect pests in wild relatives of cultivated potato. *Crop science*, 49(4), 1367-1376.

Spooner, D.M., Ghislain, M., Simon, R., et al. (2014). Systematics, Diversity, Genetics and Evolution of Wild and Cultivated Potatoes. *Bot Rev* 80:283-383.

Stackebrandt, E., Murray, R.G.E., Truper, H.G. (1988). Proteobacteria classes nov., a name for the phylogenetic taxon including the "purple bacteria and their relatives". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38:321-25.

Stevenson, W. R., Loria, R., Franc, G. D., Weingartner, D. P. (Eds.). (2001). *Compendium of potato diseases*.

Storey, M. (2007). The Harvested Crop. In: D. Vreugdenhil (Ed.), *Potato Biology and Biotechnology Advances and Perspectives* (pp. 441–470). Elsevier, Oxford.

Subedi, N., Taylor, C. G., Paul, P. A., Miller, S. A. (2019). Combining partial host resistance with bacterial

- biocontrol agents improves outcomes for tomatoes infected with *Ralstonia pseudosolanacearum*. *Crop. Protection*.
- Swanepoel, A.E. (1990). The effect of temperature on the development of wilting and on progeny tuber infection of potatoes inoculated with South African strains of biovar 2 and 3 of *Pseudomonas solanacearum*. *Potato Res.* 33:287-90.
- Tans-Kersten, J., Huang, H.Y., et al. (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence in tomato. *J Bacteriol.* 183:3597-3605.
- Tarn, T., Hawkes, J. (1986). Cytogenetic studies and the occurrence of triploid in the wild potato species *Solanum commersonii* Dun. 35:293-302.
- Thurston, H.D., Lozano, J.C. (1968). Resistance to bacterial wilt of potatoes in Colombian clones of *Solanum phureja*. *Am. Potato. J.* 45:51-55.
- Tu, W., Dong, J., Zou, Y., Zhao, Q., Wang, H., Ying, J., et al. (2021). Interspecific Potato Somatic Hybrids Between *Solanum malmeanum* and *S. tuberosum* Provide Valuable Resources for Freezing-Tolerance Breeding. *Research Square*. 1-14.
- Tung, P. X., Th. Hermsen, J. G., Vander Zaag, P., Schmiediche, P. E. (1993). Inheritance of resistance to *Pseudomonas solanacearum* EF Smith in tetraploid potato. *Plant breeding*, 111(1), 23-30.
- Van Hintum, T.J.L. (1999). The general methodology for creating a core collection. En: *Core collections for today and tomorrow*. Johnson, R.C., Hodgkin, T. (Eds). 10-17.
- Van Hintum, T.J.L., Brown, A.H.D., Spillane, C., Hodgkin, T. (2000). Core collections of plant genetic resources. *IPGRI Technical Bulletin*. International plant genetic resources institute, Rome.
- Vasse, J., Frey, P., et al. (1995). Microscopic studies of intracellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Mol Plant-Microbe Interact.* 175:5477-5487.
- Vázquez, A., González, G., Ferreira, F., Moyna, P., Kenne, L. (1997). Glycoalkaloids of *Solanum commersonii* Dun. ex Poir. *Euphytica*, 95(2), 195-201.
- Vilaró, F. (1990). Programa de mejoramiento genético de papa del Uruguay. Hidalgo, O. A.; Rincón, H (ed.). *Avances en el mejoramiento genético de la papa en los países del cono sur*. CIP, Lima. 19-30.
- Watanabe, K., El-Nashaar, H. M., Iwanaga, M. (1992). Transmission of bacterial wilt resistance by First Division Restitution (FDR) 2n pollen via 4x× 2x crosses in potatoes. *Euphytica*, 60(1), 21-26.
- Wenneker, M., Verdel, M.S.W., et al. (1999). *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* race 3 (biovar 2) in surface water and natural weed hosts: first report on stinging nettle (*Urtica dioica*). *Eur J Plant Pathol.* 105(3):307-315.
- Xue, H., Lozano-Duran, R., Macho, A.P. (2020). Insights into the Root Invasion by the Plant Pathogenic Bacterium *Ralstonia solanacearum*. *Plants*. 9:516.
- Yao, J., Allen, C. (2006a). Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol.* 188:3697-3708.
- Yao, J., Allen, C. (2006b). The role of bacterial aerotaxis in *Ralstonia solanacearum* interactions with host plants. *Phytopathology*. 96:128-135.
- Yao, J., Allen, C. (2007). The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm

formation and interactions with its tomato host. 189:6415-6424.

Zuluaga, A. P., Solé, M., Lu, H., Góngora-Castillo, E., Vaillancourt, B., Coll, N., et al. (2015). Transcriptome responses to *Ralstonia solanacearum* infection in the roots of the wild potato *Solanum commersonii*. *BMC genomics*, 16(1), 1-16.