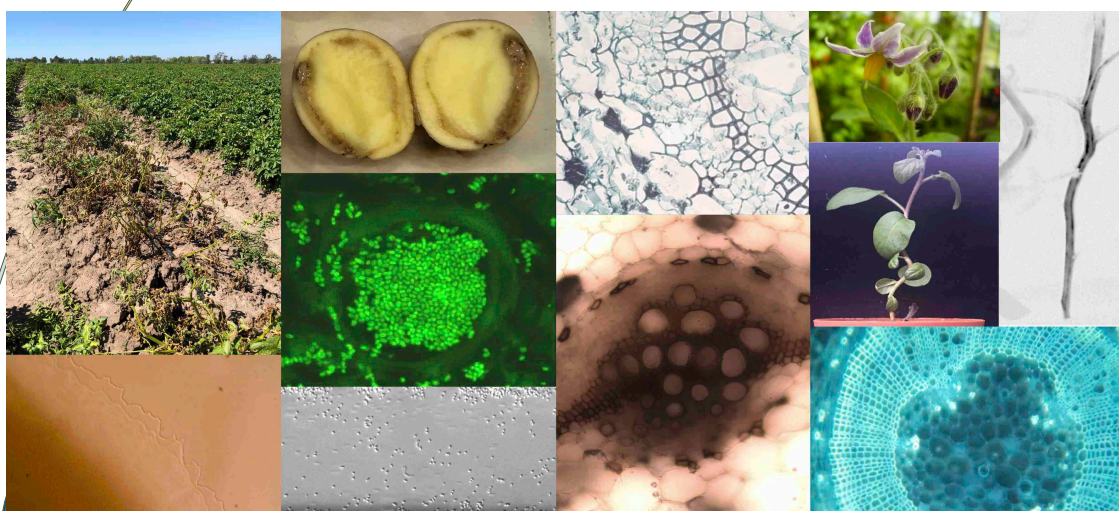


Estudio de la interacción entre *Ralstonia solanacearum* y *Solanum commersonii*

María Virginia Ferreira

Trabajo presentado para obtener el título de
DOCTOR EN QUÍMICA



**Estudio de la interacción entre *Ralstonia solanacearum*
y *Solanum commersonii***

María Virginia Ferreira

**Trabajo presentado para obtener el título de
DOCTOR EN QUÍMICA**

Directores de Tesis:

Dra. María Inés Siri

Dr. Marc Valls

Director académico:

Dra. María Julia Pianzzola

Tribunal evaluador:

Dra. Silvana Vero

Dr. Raúl Platero

Dr. Mauricio Rossato

PEDECIBA Química

Área Microbiología, DEP BIO

Facultad de Química, Universidad de la República

Setiembre 2019

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerle a María Inés, por la confianza a lo largo de estos 6 años, por la dedicación y el apoyo incondicional. Gracias por creer en mi trabajo, hasta cuando pasamos por momentos de resultados difíciles y por ayudarme en lo que necesitara. Agradecerle también por las largas charlas donde me transmitió todo su conocimiento y me aconsejó desde el lado de su experiencia. Agradecerle por hacer que todo este camino fuera un aprendizaje constante tanto a nivel profesional como personal y además disfrutable, donde siempre pude trabajar sin presiones y plantear mis ideas. Por último agradecerle por su optimismo, gran generosidad y cariño.

Un gran agradecimiento a María Julia, por estar siempre, apoyando nuestras ideas y proyectos planteados, siempre dándonos su respaldo. Agradecerle por la motivación constante, por transmitirnos siempre sus conocimientos, su experiencia y por confiar en mi cuando me abrió las puertas del laboratorio de Microbiología Molecular.

Un agradecimiento muy especial a Marc, mi co-tutor, por abrirme las puertas de su laboratorio en Barcelona en dos ocasiones, por confiar siempre en nuestro trabajo, por la motivación constante y por estar siempre dispuesto a colaborar en lo que necesitáramos desde la distancia. Agradecerle por hacer posible mi primer experiencia con el mundo de la ciencia fuera de Uruguay, lo que generó un aprendizaje enorme en mi carrera como investigadora.

A PEDECIBA, CAP, CSIC, ANII, AUGM, INIA que fueron las instituciones que proporcionaron diferentes fuentes de financiamiento e hicieron posible este proyecto de investigación.

A todo el grupo de investigadores y técnicos de INIA. En especial a Paco, por ser mi referente en toda la información relacionada a papa y *commersonii*, por estar siempre dispuesto a brindarnos sus conocimientos y su ayuda. A Marco, por hacerme parte del grupo de papa transgénica. A Alicia, Rafa, Matías, por su ayuda y apoyo como investigadores. Por otro lado, agradecer a Sarita, Maribel y Marlene, por ayudar a mantener vivas mis plantas.

Por parte de Facultad de Agronomía, agradecer a Guille y a los técnicos de CRS, por posibilitarnos el uso de los laboratorios, cámaras e invernaderos y brindarnos su ayuda.

Agradecimientos

En Barcelona, agradecer a Paola y Freddy, por su ayuda en la construcción de las cepas reporteras. A Paola en especial, por ser mi supervisora en la pasantía. A Montse por su ayuda en la multiplicación de las plantas, a Nuria y a todos los estudiantes del grupo de Marc por hacerme sentir en casa.

En Rosario, agradecerle a Elena por abrirme las puertas de su laboratorio y ayudarme con la vivienda. A Vicky, por ser mi referente en botánica, microscopía y tinciones y por hacerme el aguante cuando estaba sola. A los investigadores y estudiantes del laboratorio de Elena, por asistirme en lo académico y por integrarme en los eventos sociales.

En EEUU, agradecerle a Leo por abrirme las puertas de su laboratorio, por su ayuda en los traslados y por siempre estar dispuesto a ayudarnos en los nuevos proyectos. A Eber, mi amigo cubano, el aprendiz de confocal, por ayudarme con las cámaras de microfluído.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Microbiología, por la confianza, por hacerme sentir que puedo contar con ellos ante cualquier inquietud o problema, por todas las instancias compartidas, por el buen ambiente de trabajo y por brindarme su ayuda.

Un agradecimiento muy especial, a mis compañeros del “12”, por hacer el mejor ambiente de trabajo, es un placer ir a trabajar todos los días. A mis antiguos compañeros del 12: Analía, Rodrigo, Diego, Mari y Matías. A Analía en especial, por ayudarme y responderme todo sobre *Ralstonia* cuando recién empezaba el posgrado. Por otro lado a Sonia y Gianna, por ser mis referentes después de mis jefas, por siempre estar dispuestas a asistirme en lo académico y personal. Al actual “12”, gracias por todos sus conocimientos compartidos, por todos los favores, por hacerme el aguante principalmente en la última etapa de escritura de la tesis y por todas las experiencias vividas! Con cada uno tengo algo en común y de verdad los quiero!!

A Stefanie, mi primer capacitación, por el trabajo dedicado y por hacerme crecer en ese nuevo rol como supervisora.

A Ariel, por ayudarme en todo lo informático, por hacer posible el funcionamiento de mis videos con bacterias en las presentaciones. Genio!

Agradecimientos

A Nicol, por todo el enorme y gran trabajo dedicado, por los cientos de experimentos que me ayudaste, por todas las horas con los genes, por el imposible xilema, por ser mis ojos cuando no estaba, por las charlas en el invernadero, etc. Gracias por tu disposición, por la sinceridad y por tu gran amistad.

A Luca, Giusy, Cyn y Jose, mis amigos internacionales que conocí gracias a la ciencia, gracias por todas las charlas científico-amistosas y por el cariño. A Jose y Cyn especialmente, por estar siempre presente a pesar de la distancia.

En especial quiero agradecerle a mi familia, por el amor y el apoyo incondicional. A mis padres, mi hermana, mi ahijada, mis abuelos, mis tíos, mi madrina, gracias por ser mi respaldo.

A mis amigas, Isa, Mari, Tefa, Pia y Noe, por estar siempre, en las buenas y en las malas, por quererme como soy y por querer compartir sus vidas conmigo a lo largo de todos estos años.

A Vale mi amor, que me conoció ya transitando esta tesis, gracias por el amor, la contención y el apoyo incondicional. Gracias por hacerme el aguante durante todo este trabajo, las pasantías que estuvimos separados y principalmente en la recta final de la escritura de la tesis.

RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es uno de los cultivos más importantes afectado por *Ralstonia solanacearum*, bacteria fitopatógena causante de la marchitez bacteriana. Una de las estrategias más efectivas para el control de esta enfermedad es el uso de cultivares resistentes. La estrategia adoptada por el programa nacional de mejoramiento genético de papa desarrollado en INIA, implica la introgresión de genes de resistencia a partir de la especie nativa silvestre *Solanum commersonii*, ampliamente distribuida y adaptada a nuestras condiciones ambientales. El objetivo general de esta tesis fue generar conocimiento sobre el patosistema *R. solanacearum* - *S. commersonii* para contribuir al desarrollo de cultivares con resistencia a esta bacteria fitopatógena y al control integrado de la marchitez bacteriana. Se evaluó la resistencia en germoplasma derivado del programa de mejoramiento y se seleccionaron genotipos con resistencia parcial altamente tolerantes que fueron utilizados como progenitores en los sucesivos cruzamientos. Además, se seleccionaron genotipos con diferentes niveles de resistencia para continuar con los estudios de las interacciones planta-patógeno. Para realizar el seguimiento de la colonización de la bacteria *in planta*, se construyeron y validaron cepas reporteras de *R. solanacearum* con actividad fluorescente (proteína verde fluorescente, GFP) y luminiscente (operón *luxCDABE*, LUX). Los resultados obtenidos sugieren que la resistencia a la marchitez bacteriana en papa está relacionada con la capacidad de la planta de restringir la colonización y multiplicación del patógeno, particularmente limitando la diseminación a lo largo del tallo. A su vez, se observaron varias respuestas de defensa inducidas luego de la infección con la bacteria en los genotipos con resistencia parcial como deposición de lignina, producción de especies reactivas del oxígeno, tílides, un aumento del intercambio de electrolitos a través de la membrana y cambios a nivel de la expresión de genes de defensa. También se analizó la composición mineral de la savia xilemática, hoja, tallo y raíz de los genotipos seleccionados encontrando mayores concentraciones de Ca a nivel de tallo y savia xilemática en el genotipo parcialmente resistente. Este mineral tiene un efecto inhibitor del crecimiento de *R. solanacearum* y sobre características asociadas a la virulencia como la formación de *biofilm*, adhesión y la movilidad tipo *twitching*. El agregado exógeno de sales de Ca retrasó y disminuyó la severidad de síntomas de marchitamiento en plantas susceptibles y resistentes inoculadas con *R. solanacearum*. Este efecto también se observó cuando se incubó a la bacteria en cámaras de microfluído, logrando optimizar por primera vez este modelo para el estudio de este patógeno bajo condiciones de flujo.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN	iv
ÍNDICE	v
ABREVIATURAS	viii
CAPÍTULO 1.....	1
1.1 Introducción General.....	2
1.1.1 Características del patógeno.....	2
1.1.2 Características del hospedero: <i>Solanum tuberosum</i> L.	6
1.1.3 Ciclo de la enfermedad y diseminación del patógeno.	8
1.1.4 Mecanismos de defensa vegetal.....	12
1.1.5 Base genética de la resistencia a <i>R. solanacearum</i>	13
1.1.6 Estrategias de control de la marchitez bacteriana.....	15
1.1.6.1 Control químico.	16
1.1.6.2 Rotación de cultivos.....	19
1.1.6.3 Control biológico.....	19
1.1.6.4 Resistencia del hospedero.	21
1.1.6.5 Manejo integrado de la enfermedad.	22
1.1.7 Importancia de la marchitez bacteriana de la papa.....	23
1.1.8 Mejoramiento de papa por resistencia a <i>R. solanacearum</i> en Uruguay.....	25
1.2 Estructura general de esta Tesis.	26
CAPÍTULO 2.....	28
2.1 Introducción.	30
2.2 Objetivos.	35
2.2.1 Objetivo General.	35
2.2.2 Objetivos Específicos.....	35
2.3 Materiales y Métodos.	37
2.3.1 Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento.....	37
2.3.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento.	37
2.3.3 Evaluación de resistencia a la marchitez bacteriana.....	39
2.3.3.1 Ensayos de inoculación.	39
2.3.3.2. Detección de infecciones latentes.	40
2.3.4 Desarrollo de cepas reporteras.....	41
2.3.4.1 Construcción de vectores con los sistemas reporteros.	41
2.3.4.2 Integración de los sistemas reporteros en el genoma de <i>R. solanacearum</i> UY031.....	42
2.3.5 Validación de las cepas reporteras.	44
2.3.5.1 Verificación de integraciones mediante PCR.....	44
2.3.5.2 Evaluación de la virulencia de las cepas reporteras desarrolladas.....	45
2.3.5.3 Evaluación de la emisión de fluorescencia y luminiscencia <i>in vitro</i>	45
2.3.5.4 Evaluación de la emisión de fluorescencia y luminiscencia <i>in planta</i>	46
2.3.6 Análisis estadístico.	48
2.4 Resultados.	50
2.4.1 Evaluación de resistencia a <i>Ralstonia solanacearum</i> en germoplasma del programa de mejoramiento genético de papa (INIA).....	50
2.4.2 Construcción de cepas reporteras de <i>R. solanacearum</i>	59
2.4.3 Validación de las cepas reporteras desarrolladas.	61
2.4.3.1 Verificación de integraciones mediante PCR.....	61
2.4.3.2 Evaluación de la virulencia de las cepas reporteras desarrolladas.....	62
2.4.3.3 Evaluación de la emisión de fluorescencia y luminiscencia <i>in vitro</i>	65

2.4.3.4 Evaluación de las cepas reporteras fluorescentes <i>in planta</i>	67
2.4.3.5 Evaluación de las cepas reporteras luminiscentes <i>in planta</i>	71
2.5 Discusión.	78
CAPÍTULO 3.....	87
3.1 Introducción.	89
3.2 Objetivos.	92
3.2.1 Objetivo General.....	92
3.2.2 Objetivos Específicos.....	92
3.3 Materiales y Métodos.	94
3.3.1 Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento.....	94
3.3.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	94
3.3.4 Ensayos de inoculación.....	95
3.3.5 Seguimiento del proceso de infección.....	95
3.3.5.1 Seguimiento de <i>R. solanacearum in planta</i> mediante detección y cuantificación de luminiscencia.....	95
3.3.5.1 Visualización del patógeno <i>in planta</i> mediante microscopía confocal de fluorescencia.....	96
3.3.6 Tinciones histológicas diferenciales.....	97
3.3.6.1 Evaluación de deposición de lignina.....	97
3.3.6.2 Deposición de calosa.....	98
3.3.6.3 Detección de especies reactivas del oxígeno (ROS).....	98
3.3.7 Intercambio de electrolitos a través de la membrana.....	99
3.3.8 Cuantificación relativa de genes candidatos de defensa mediante RT-qPCR.....	100
3.3.8.1 Selección de genes candidatos y diseño de primers.....	100
3.3.8.2 Procesamiento de muestras para extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	102
3.3.8.3 Amplificación por RT-qPCR.....	102
3.3.9 Análisis de datos.....	103
3.4 Resultados.	105
3.4.1 Caracterización de la resistencia a <i>R. solanacearum</i> mediante detección y cuantificación de luminiscencia.....	105
3.4.2 Caracterización de la resistencia a <i>R. solanacearum</i> mediante microscopía confocal de fluorescencia.....	108
3.4.3 Deposición de lignina y calosa en respuesta a la infección con <i>R. solanacearum</i>	114
3.4.4 Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) como respuesta a la infección de <i>R. solanacearum</i>	118
3.4.5 Evaluación del intercambio de electrolitos en respuesta a la infección por <i>R. solanacearum</i>	120
3.4.6 Expresión de genes candidatos de defensa vegetal.....	121
3.5 Discusión.	124
CAPÍTULO 4.....	131
4.1 Introducción.	133
4.2. Objetivos.	136
4.2.1 Objetivo General.....	136
4.2.2 Objetivos Específicos.....	136
4.3 Materiales y Métodos.	138
4.3.1 Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento.....	138
4.3.2 Material vegetal y ensayos de inoculación.....	138
4.3.3 Procesamiento de muestras para cuantificación de metales.....	139
4.3.4 Extracción de savia xilemática (SX).....	139
4.3.5 Cuantificación del ionoma.....	140
4.3.6 Curvas de crecimiento.....	141
4.3.7 Cuantificación de <i>biofilm</i> en placas de microtitulación.....	141
4.3.8 Análisis de la formación de <i>biofilm</i> mediante microscopía confocal de fluorescencia.....	142
4.3.9 Análisis de la movilidad tipo <i>twitching</i>	142

4.3.10 Incubación de <i>R. solanacearum</i> en cámaras de microfluído (CM).....	143
4.3.10.1 Construcción y armado de las cámaras.	143
4.3.10.2 Funcionamiento y parámetros críticos.	145
4.3.10.3 Optimización de condiciones para el cultivo de <i>R. solanacearum</i>	146
4.3.10.4 Seguimiento del crecimiento de <i>R. solanacearum</i>	147
4.3.11 Análisis del efecto del calcio sobre la marchitez bacteriana.....	147
4.3.12 Análisis de datos.	148
4.4 Resultados.	150
4.4.1 Análisis del ionoma en plantas de papa con diferentes niveles de resistencia a <i>R. solanacearum</i>	150
4.4.2 Efecto del calcio en el crecimiento de <i>R. solanacearum</i>	155
4.4.3 Efecto del calcio en la formación de <i>biofilm</i>	156
4.4.4 Efecto del calcio sobre la movilidad tipo <i>twitching</i>	159
4.4.5 Cultivo de <i>R. solanacearum</i> bajo condiciones de flujo en cámaras de microfluído (CM).	161
4.4.6 Efecto del calcio sobre el crecimiento y la formación de <i>biofilm</i> en condiciones de flujo en cámaras de microfluído.	163
4.4.7 Efecto del calcio sobre la marchitez bacteriana.....	164
4.5. Discusión.	169
CAPÍTULO 5.....	178
5.1 Discusión general.....	179
5.2 Conclusiones.....	184
5.3 Perspectivas.....	186
APÉNDICES.....	187
1. Medios de cultivo.	188
2. Buffers y soluciones.....	194
3. Condiciones optimizadas para la detección de <i>R. solanacearum</i> por multiplex-PCR.	195
4. Curvas de eficiencia de los genes seleccionados y los genes de referencia.	196
5. Tabla de vectores utilizados en este trabajo.	205
BIBLIOGRAFÍA	206
ANEXOS	225

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
Ag	Plata
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
B	Boro
Ca	Calcio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
Cd	Cadmio
Cl	Cloro
CM	Cámara de microfluido
cm	Centímetro
cm ³	Centímetro cúbico
Co	Cobalto
CPG	Medio rico (Casaminoácidos-peptona-glucosa)
Ct	<i>Threshold cycle</i>
Cu	Cobre
cv.	Cultivar
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
dpi	Días post inoculación
Fe	Hierro
g	Ggramo

Abreviaturas

GC	Guanina-citocina
GFP	Proteína verde fluorescente
h	Horas
K	Potasio
Kb	Kilobases
kg	Kilogramo
l	Litro
M	Molar
Mg	Magnesio
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ml	Mililitro
MM	Medio mínimo
mM	Milimolar
Mn	Manganeso
Mo	Molibdeno
mV	Milivolt
Na	Sodio
ng	Nanogramos
Ni	Niquel
nm	Nanómetros
OD	Densidad óptica
P	Fósforo
Pb	Pares de bases
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

Abreviaturas

PM	Peso molecular
RFU	Unidades relativas de fluorescencia
RLU	Unidades relativas de luminiscencia
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	PCR en tiempo real
S	Azufre
seg	Segundos
SF	Suero fisiológico
Si	Silicio
SX	Savia xilemática
Tm	Temperatura de fusión
TTC	Cloruro de trifenil-tetrazolio
ufc	Unidad formadora de colonia
UV	Ultravioleta
Zn	Zinc
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µm	Micrometro
µm ²	Micrometro cuadrado
µM	Micromolar

CAPÍTULO 1

Introducción General

1.1 Introducción General.

1.1.1 Características del patógeno.

Ralstonia solanacearum fue descrita por primera vez por Erwin F. Smith en 1896 y fue nombrada como *Bacillus solanacearum* (Smith, 1896). En 1914, Smith cambió su nombre a *Pseudomonas solanacearum* (Smith, 1914), denominación que se incluyó en las listas aprobadas de nombres bacterianos (Skerman et al., 1980), y bajo la cual se publicó una gran cantidad de literatura referida a este patógeno. Más tarde, Yabuuchi et al. (1992) transfirieron *P. solanacearum* a un género llamado *Burkholderia*. Posteriormente, Yabuuchi et al. (1995) concluyeron que *Burkholderia solanacearum* era lo suficientemente diferente de otros miembros dentro del género para ser asignado en el género recién propuesto, *Ralstonia*. Hasta la fecha, el nombre científico del patógeno es *Ralstonia solanacearum* (García et al., 2019).

R. solanacearum constituye un complejo de especies altamente heterogéneo que abarca diferentes cepas y especies. Tradicionalmente, *R. solanacearum* fue clasificada en 5 razas y 6 biovares dependiendo de la especificidad del hospedero y de la capacidad metabólica de la bacteria para utilizar diferentes fuentes de carbono respectivamente (Buddenhagen et al., 1962; Hayward, 1964; Denny, 2006). A pesar de que estas clasificaciones fueron utilizadas por varios años, la clasificación en razas se transformó en un predictor irreal de potencial patogénico, porque varias variables como el cultivar del hospedero, condiciones de crecimiento, inóculo, concentración y método de inoculación podían influenciar el resultado. Por otro lado, la clasificación en biovares está basada en unas pocas características, por lo que una mutación espontánea puede cambiar el perfil de la reacción ofreciendo resultados confusos y poco precisos (Alvarez, 2005; Denny, 2006). Debido a estas razones, *R. solanacearum* es actualmente clasificada en 4 filotipos basados en la diversidad genética y origen evolutivo de las cepas. Los filotipos pueden ser identificados específicamente a través la secuencia intergénica 16S-23S del ARNr. Cada filotipo, a su vez está subdividido en secuevares que se definen como grupos de cepas con secuencias altamente conservadas de los genes *hrpB*, *egl* y *mutS*. Los filotipos I, II y III contienen cepas con origen en Asia, América y África respectivamente, mientras que el filotipo IV contiene cepas aisladas principalmente de Indonesia, algunos aislamientos de Australia, Japón, Filipinas e incluye también a las especies relacionadas *R. syzigii* y el patógeno de banana *R. celebensis*, también conocido como BDB (*Blood Disease Bacterium*). Ambos organismos se incluyeron en el complejo de especies de *R. solanacearum* en base al análisis comparativo de la secuencia del gen 16S ARNr (Fegan y Prior, 2005;

Safni et al., 2014). En una revisión taxonómica reciente, *R. solanacearum* ha sido clasificada en 3 especies separadas dentro del complejo de especies. Esta reclasificación está sustentada en estudios a nivel genómico y proteómico y es un reflejo de la gran diversidad de cepas que abarca el complejo de especies *R. solanacearum*. En esta nueva clasificación, la especie *R. solanacearum* incluye únicamente cepas pertenecientes al filotipo II. La nueva especie *R. pseudosolanacearum* incluye cepas de los filotipos I y III y las cepas que pertenecían al filotipo IV fueron asignadas a la especie *R. syzygii* (Figura 1.1) (Safni et al., 2014; Prior et al., 2016).

En la tabla 1.1 se puede observar como se relacionan las distintas clasificaciones actualmente.

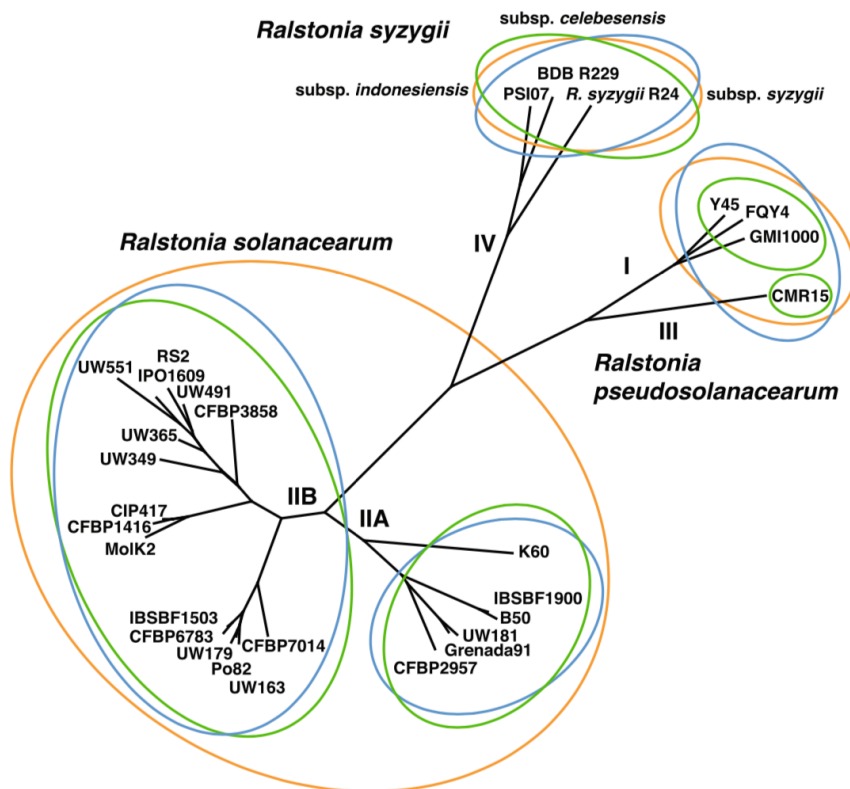


Figura 1.1. Árbol filogenético de la nueva clasificación del complejo de especies de *Ralstonia solanacearum*, extraído de Prior et al. (2016). Los círculos representan la agrupación de cepas según diferentes métodos de comparación de genomas, *Average Nucleotide Identity* (Naranja), *Maximun Unique Matches index* (Azul) y *Genome-to-genome distance calculator* (verde) utilizados en el trabajo.

Tabla 1.1 Clasificación actual de *Ralstonia solanacearum* y su relación con clasificaciones tradicionales, adaptado de García et al., 2019.

Especie	Filotipo	Secuevar	Hospedero	Raza	Biovar
<i>R. pseudosolanacearum</i>	I	12, 14, 16, 18	Solanaceas, jengibre, mora	1, 4, 5	3, 4, 5
<i>R. solanacearum</i>	IIA	5, 6, 7	Solanaceas, banana	1, 2, 3	2-T, 1, 2
<i>R. solanacearum</i>	IIB	1, 2, 3, 4	Papa, tomate, geranio, banana	1, 2, 3	2-T, 1, 2
<i>R. pseudosolanacearum</i>	III	19, 20, 21, 22, 23	Solanaceas,	1	2-T, 1
<i>R. syzigii</i>	IV	8, 9, 10, 11	Solanaceas,, Banana, clavo de olor	1	2-T, 1, 2

Las cepas que afectan a la papa en climas templados como en Uruguay, tradicionalmente conocidas como raza 3, actualmente se clasifican dentro de la especie *R. solanacearum*, filotipo IIB, secuevar 1 (IIB-1) (Siri et al., 2011). Este grupo está constituido por cepas genéticamente muy relacionadas, con un rango de hospederos bastante acotado, caracterizadas por presentar alta virulencia en climas fríos y la capacidad de producir infecciones latentes asintomáticas que enmascaran al patógeno favoreciendo su diseminación (Cellier and Prior, 2010).

R. solanacearum es una bacteria gram negativa, aerobia, móvil, con un flagelo polar. La mayoría de sus cepas desnitrifica y produce un pigmento marrón en medio nutriente (Denny, 2006). *R. solanacearum* es el agente causal de la marchitez bacteriana considerada una de las enfermedades de plantas de mayor impacto económico a nivel mundial (Elphinstone, 2005; Mansfield et al., 2012). Este patógeno afecta a más de 250 especies vegetales dentro de 50 familias, principalmente dicotiledóneas de la familia de las solanaceas. Algunas monocotiledóneas, diversas especies silvestres, arbustos, árboles y cultivos también pueden ser afectados por esta bacteria. Además de su amplio rango de hospederos, *R. solanacearum* tiene una amplia distribución geográfica afectando especies de zonas tropicales, subtropicales y templadas (Genin y Denny, 2012; Peeters et al., 2013a; Garcia et al., 2019). Entre los cultivos de importancia económica susceptibles a *R. solanacearum* se encuentran papa, tomate, morrón, tabaco, berenjena, banana, oliva, jengibre, geranio, mora y maní (Elphinstone, 2005; Garcia et al., 2019). En Uruguay, *R. solanacearum* afecta principalmente al cultivo de papa constituyendo uno de los principales

riesgos sanitarios debido a los daños directos e indirectos que puede provocar sobre la producción, la semilla y el suelo (Pianzzola et al., 2012).

Se trata de un patógeno de suelo que también puede sobrevivir como microorganismo saprófito por largos períodos de tiempo en hábitats naturales como aguas superficiales, malezas, restos de cultivos y diferentes tipos de suelos (Hayward, 1991). Se postula que *R. solanacearum* existe en la naturaleza en dos estadios fisiológicos, uno adaptado a la sobrevivencia saprofita en el ambiente y otro adaptado a la patogenicidad en el hospedero (Denny, 2005).

R. solanacearum es considerado un sistema modelo para el estudio de los mecanismos de virulencia y de interacción planta-patógeno. El primer genoma completo de esta bacteria fue publicado en el año 2002, siendo uno de los primeros microorganismos fitopatógenos en ser secuenciado (Salanoubat et al., 2002). Actualmente se dispone de la secuencia completa de 122 cepas pertenecientes a diversos filotipos lo que aporta información fundamental para la profundización en los factores de virulencia y especificidad de hospedero (GenBank, 2019).

El principal factor de virulencia es el exopolisacárido (EPS) producido en grandes cantidades por *R. solanacearum* en cultivo *in vitro* y cuando se multiplica a nivel del sistema vascular de la planta, contribuyendo a la oclusión de los vasos de xilema y a la manifestación de los síntomas de marchitamiento. Se ha postulado que el EPS también contribuye a la virulencia durante la etapa de colonización, así como retardando el reconocimiento del patógeno por la planta y el desencadenamiento de las respuestas de defensa (Genin y Denny, 2012; Meng, 2013). Otro importante determinante de la patogenicidad en *R. solanacearum* es el sistema de secreción de tipo III (T3SS), un apéndice de membrana similar a una jeringa que inyecta en el citosol de la célula vegetal un arsenal de proteínas efectoras que actúan a diferentes niveles para favorecer la infección (Boucher et al., 1985; Coll and Valls, 2013). Este sistema juega un rol esencial en la patogénesis de la mayoría de las bacterias gram negativas patógenas de plantas y animales (Cornelis and Van Gijsegem, 2000). En *R. solanacearum* se han identificado más de 90 proteínas efectoras que son translocadas a través de este sistema que actúan favoreciendo la infección, principalmente a través de la manipulación de los mecanismos de defensa de la planta (Poueymiro and Genin, 2009; Peeters et al, 2013b). Se han descrito además, otros múltiples factores que también tienen un efecto importante en la virulencia de este patógeno incluyendo enzimas que degradan la pared celular vegetal, movilidad tipo *swimming* a través del flagelo, movilidad tipo

twitching a través del pili tipo IV, fijación a superficies del hospedero, sistemas de protección frente al estrés oxidativo, sideróforos, adhesinas, etc.

Los factores de virulencia de *R. solanacearum* tienen un efecto aditivo, ninguno explica independientemente la virulencia de la marchitez bacteriana. La expresión de los factores de virulencia está controlada por un complejo sistema que responde a las condiciones ambientales, la presencia de las células del hospedero y la densidad bacteriana. Este sistema está regulado principalmente por el sistema *quorum sensing* orquestado por el factor de transcripción PhcA (Genin y Denny, 2012; Meng, 2013; Lowe-Power et al., 2018a; Lowe-Power et al., 2018b). Algunas de las moléculas señal que se producen luego que la bacteria logra evadir el sistema inmune de la planta hospedera, son metil 3-hidroxi palmitato y metil 3-hidroxi miristato. Cuando estas moléculas alcanzan un nivel umbral, inducen la activación de la proteína PhcA. La presencia del patógeno en concentraciones mayores a 10^6 ufc/ml tiene un alto nivel de PhcA funcional, lo que induce la producción de múltiples factores de virulencia como el EPS y reprime los factores para la invasión y supervivencia como el T3SS y la movilidad tipo *swimming* (Hikichi et al., 2017).

1.1.2 Características del hospedero: *Solanum tuberosum* L.

La papa (*Solanum tuberosum* L.), pertenece a la familia *Solanaceae* y al género *Solanum*, que comprende alrededor de 2000 especies, mientras que la subsección de papa contiene 235 especies. Las especies productoras de tubérculos cultivadas son 7: *S. ajanhuiri*, *S. chaucha*, *S. curtilobum*, *S. juzepczukii*, *S. phureja*, *S. stenotomum* y *S. tuberosum* (Huaman y Spooner, 2002; Patel et al., 2018). Sin embargo, solo *Solanum tuberosum*, se ha cultivado comercialmente a nivel global, mientras que las otras especies son cultivadas en algunos países de América de Sur (Perú, Chile, Bolivia, Ecuador, Venezuela, Argentina y Colombia). *S. tuberosum* tiene 12 cromosomas haploides y 48 cromosomas somáticos (tetraploide). Alrededor del 74% de las especies de tuberosas son diploides ($2n = 24$) y el resto son poliploides, tetraploides ($2n = 48$), pentaploides ($2n = 60$) y hexaploides ($2n = 72$) (Huaman y Spooner, 2002; Patel et al., 2018).

América del Sur es el principal centro de origen de muchas especies de papa. Existen 151 especies conocidas de papa silvestre, las cuales no son comestibles pero son los ancestros originales de las papas cultivadas hoy en día. Las especies silvestres se encuentran desde el suroeste de los Estados Unidos hasta el sur de Chile, pero la mayor parte de ellas se concentran en Perú y Bolivia. Crecen en diversos

suelos y climas, desde los desiertos secos de la costa peruana hasta los valles interandinos, y hasta los 4,200 metros sobre el nivel del mar. Los tubérculos de las especies silvestres son más chicos que los de las papas cultivadas y tienen variedad de formas y colores. A diferencia de las papas cultivadas, que han perdido su variación genética debido a la domesticación, las papas silvestres tienen características que se pueden usar para crear variedades de papa más nutritivas y tienen la base genética de resistencia a factores de estrés como sequía, bajas temperaturas, enfermedades y plagas (Spooner y Hijmans, 2001; CIP, 2019a; Loginov et al., 2018). Entre las especies silvestres que poseen cierto grado de resistencia se encuentran: *S. raphanifolium*, *S. chacoense*, *S. microdontum*, *S. sparsipilum*, *S. stenotomum*, *S. multidissectum* y *S. commersonii* (Boshou, 2005).

La papa es un cultivo herbáceo anual que crece hasta 100 cm de altura. A medida que crece la planta, sus hojas compuestas sintetizan almidón que es transferido a las terminaciones de sus tallos subterráneos (o estolones). Los tallos se van engrosando hasta formar un máximo de 20 tubérculos cerca a la superficie del suelo. El número de tubérculos que llegan realmente a la madurez depende de la humedad y los nutrientes disponibles en el suelo. Al término de la temporada de crecimiento, las hojas y tallos de la planta se marchitan a nivel del suelo y los nuevos tubérculos se desprenden de sus estolones. Los tubérculos sirven después como almacén de nutrientes que le permiten a la planta sobrevivir al frío y más tarde rebrotar y reproducirse. Cada tubérculo tiene entre dos y hasta 10 brotes, dispuestos en forma de espiral alrededor de su superficie. Los brotes generan rebrotes que crecen como nuevas plantas cuando las condiciones se vuelven favorables nuevamente. A diferencia de otros cultivos importantes, las papas se reproducen vegetativamente, a partir de otras papas. Por lo tanto, los tubérculos se pueden reutilizar en la siguiente temporada de siembra como tubérculos-semilla (Figura 1.2) (CIP, 2019b).

La papa está clasificada como el tercer alimento cultivado más importante después del arroz y el trigo y es consumida por más de mil millones de personas en todo el mundo (Devaux et al., 2014). La mitad de la producción total se produce en países en desarrollo, en donde produce un impacto significativo dado el alto valor nutricional que aporta este alimento. La papa está constituida aproximadamente por 75-80% de agua, 21% de carbohidratos (de los cuales aproximadamente el 82% es almidón), 2.5% de proteína, 0,8-1,2% de minerales, 0,1-0,2% de grasa y 0,6% de fibras, vitamina B y C (Bradeen et al., 2011; Patel et al., 2018).

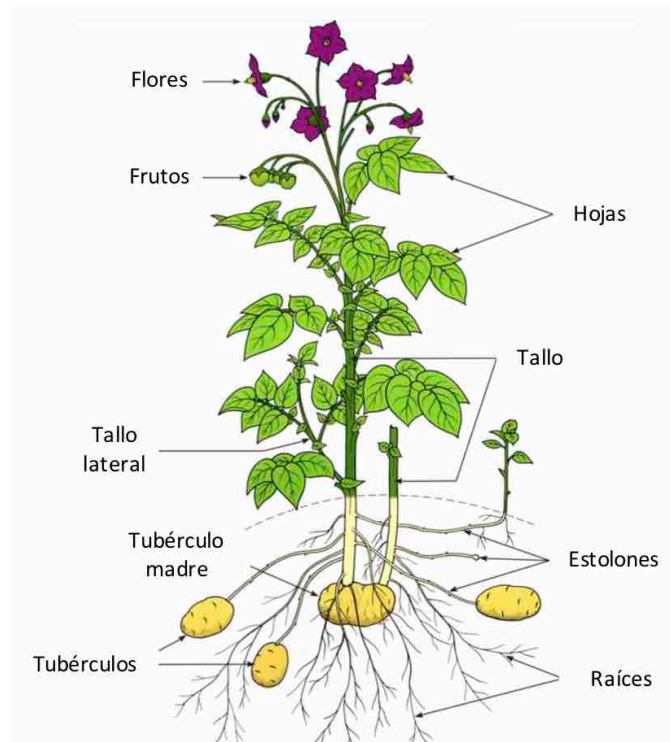


Figura 1.2. La planta de papa. Imagen adaptada de CIP, 2019b.

La capacidad de almacenamiento del tubérculo durante meses con insumos tecnológicos mínimos hace que la papa sea un alimento ideal tanto para los países desarrollados como para los países en desarrollo. Sin embargo, los rendimientos de producción son relativamente bajos en los países en desarrollo debido a la falta de tubérculos-semillas de alta calidad, una base genética acotada para el desarrollo de variedades resistentes, pérdidas debido a enfermedades y plagas, prácticas culturales inapropiadas y mal manejo poscosecha de tubérculos-semilla y papa de consumo (Agrios, 2005). La papa es susceptible a una serie de enfermedades, entre las más importantes se encuentran el tizón tardío causado por (*Phytophthora infestans* L.), la marchitez bacteriana causada por *R. solanacearum* y varias enfermedades virales (CIP, 2019c).

1.1.3 Ciclo de la enfermedad y diseminación del patógeno.

El proceso infeccioso de *R. solanacearum* se basa en la habilidad de la bacteria de alcanzar, fijarse e infectar las raíces de un hospedero susceptible, colonizar los vasos de xilema y producir los factores de virulencia (Figura 1.3-A) (Genin, 2010). En el ambiente, *R. solanacearum* es capaz de sensor y moverse en respuesta a la presencia de exudados radiculares secretados por plantas hospederas utilizando la

movilidad flagelar. La movilidad flagelar, la quimiotaxis y aerotaxis son procesos fundamentales en estas etapas tempranas de reconocimiento e infección del hospedero (Tans-Kersten et al., 2001; Yao and Allen 2006; 2007). La fijación a las raíces de la planta se da a través de estructuras presentes en la superficie celular de la bacteria como el lipopolisacárido y el pili de tipo IV (Kang et al., 2002; Denny, 2006; Lowepower et al., 2018b). La penetración ocurre principalmente por heridas presentes en los sitios de emergencia de las raíces secundarias, o las provocadas por nemátodos e insectos (Vasse et al., 1995). La bacteria va progresivamente colonizando los tejidos a nivel del cortex radicular, se ha observado que produce una rápida plasmólisis de las células epidérmicas, corticales y endodérmicas en el cortex radicular y va obteniendo nutrientes por acción de enzimas pectinolíticas (Schell, 2000; Digonnet et al., 2012). A medida que la infección progresa, el patógeno invade capas más internas de la raíz hasta lograr acceder al sistema vascular colonizando los espacios intercelulares del parénquima vascular y los vasos de xilema (Vasse et al., 1995; Saile et al., 1997; Hikichi et al., 2017). Una vez dentro del xilema, el patógeno se mueve a través del tallo diseminándose por todos los tejidos aéreos de la planta. Algunas células de *R. solanacearum* serán planctónicas en la savia xilemática y otras usarán la movilidad tipo *twitching* para moverse a lo largo de las paredes de los vasos de xilema. El tejido maduro de xilema está compuesto por 3 tipos de células diferentes: células que forman los conductos, fibras y parénquima. Las células que forman los conductos y fibras son metabólicamente inactivas y forman poros para el pasaje de agua, mientras que las células del parénquima son metabólicamente activas y se encuentran por fuera de los vasos de xilema. A su vez, estos vasos están conectados unos con otros por pequeños poros, el tamaño de esos pequeños poros va a ser la primera barrera para el pasaje de las células del patógeno (Bae et al., 2015). A nivel del xilema, el patógeno se multiplica activamente obteniendo nutrientes mediante la acción de varias enzimas que degradan las paredes vegetales, lo que lleva a alcanzar poblaciones de hasta 10^{10} células por centímetro de tallo en plantas de tomate (Figura 1.3-B) (Lowepower et al., 2018b). En esta etapa *R. solanacearum* puede crecer formando biofilms adheridos a las paredes celulares de los haces vasculares, protegiéndose así de la acción de los mecanismos de defensa de la planta (Tans- Kersten et al., 2001). La masiva multiplicación del patógeno y la producción de grandes cantidades de EPS, interfieren con el transporte de agua y solutos a través de la planta produciendo los típicos síntomas de marchitamiento (Genin, 2010; Peeters et al, 2013a). Este proceso puede culminar en la muerte de la planta y en la liberación del patógeno al ambiente, dónde puede sobrevivir de forma

saprofita por largos períodos hasta volver a infectar a un nuevo hospedero susceptible (Alvarez et al., 2010).

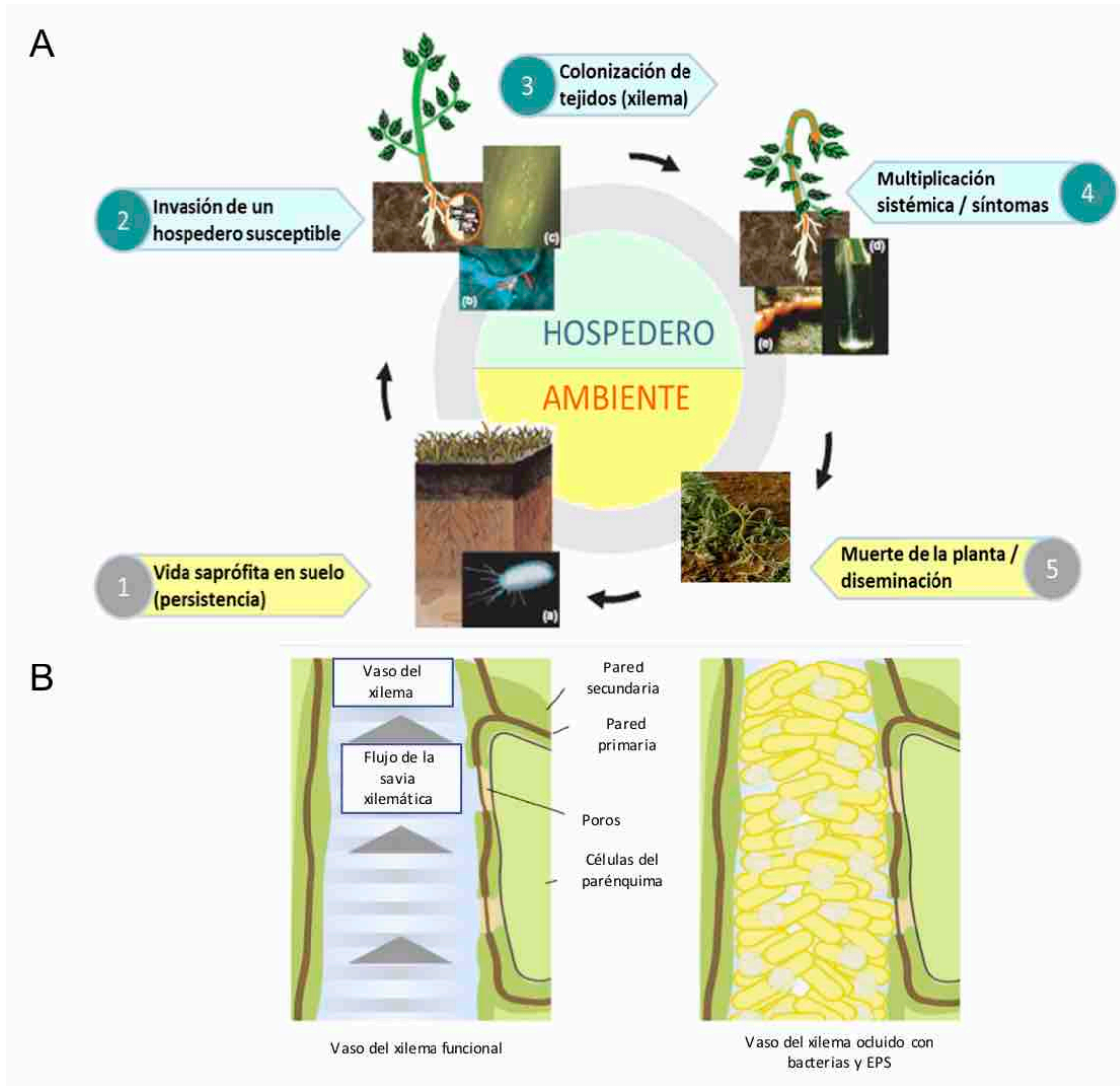


Figura 1.3. A: Ciclo infeccioso de *Ralstonia solanacearum*. a) Microscopía electrónica de la cepa de *Ralstonia pseudosolanacearum* GMI1000. (b) Observación con microscopio confocal de la bacteria (en rojo) atacando la superficie de las células de la planta. (c) Visualización del patógeno en la superficie 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). **B:** Vaso de xilema funcional (izquierda) y otro ocluido por la bacteria (derecha). Esquema adaptado de Lowe-Power et al., 2018b.

En la Figura 1.4 se muestran los síntomas típicos de la marchitez bacteriana en plantas de papa. El primer síntoma de la enfermedad es un marchitamiento de las hojas superiores las cuales adquieren progresivamente una coloración bronceada. Finalmente, se observa un marchitamiento generalizado que puede culminar con la muerte de la planta. Al cortar el tallo, se observan exudados en la zona vascular y

en el tubérculo aparece una coloración parda del anillo vascular y de los tejidos próximos, principalmente en la zona cercana al estolón. Es frecuente que aparezcan exudados blanquecinos y cremosos en esta zona, sin necesidad de presionar el tubérculo. Los síntomas exteriores pueden no ser visibles y en ocasiones se confunden con los producidos por otros patógenos. Al evolucionar la enfermedad se produce una necrosis del anillo vascular y de los tejidos adyacentes. La entrada de patógenos secundarios contribuye a que se produzca una pudrición total del tubérculo (Palomo, 2000).

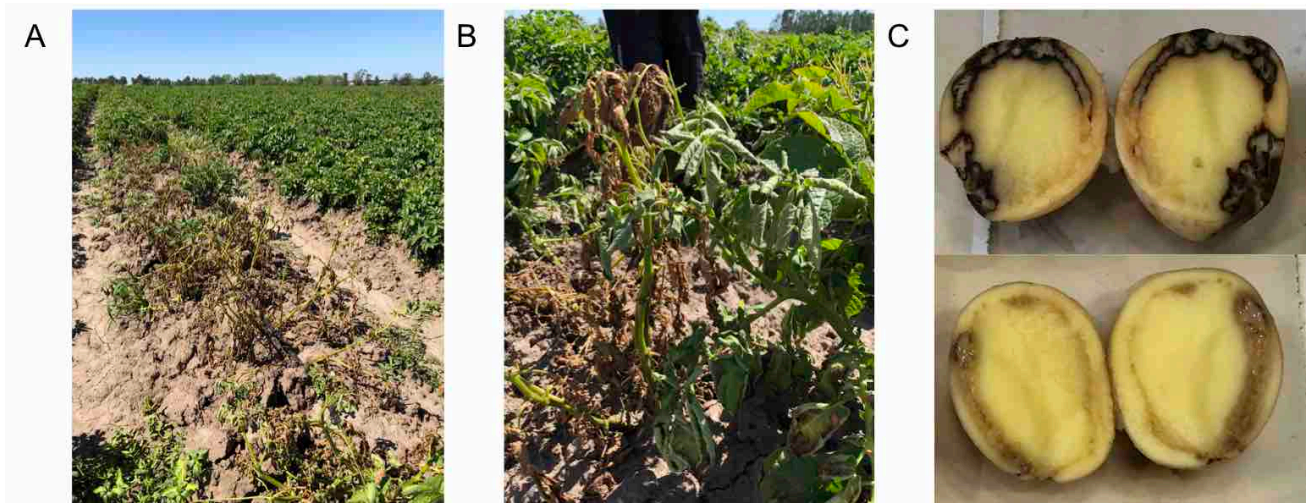


Figura 1.4. Síntomas típicos de la marchitez bacteriana de la papa causada por *Ralstonia solanacearum*. **A:** Brote localizado de marchitez bacteriana en un cultivo de papa en Uruguay, departamento de Canelones, diciembre de 2017. **B:** Marchitamiento foliar. **C:** Cortes transversales de tubérculos dónde se evidencia la producción de exopolisacáridos en el anillo vascular.

Debido a la capacidad de esta bacteria de persistir en el ambiente se reconocen diferentes vías de diseminación y propagación de la enfermedad, incluyendo el suelo contaminado, aguas superficiales y de riego, equipamiento, personal, etc. (Hayward, 1991; Janse, 1996). Los residuos de cultivos que quedan en los campos infectados por *R. solanacearum* también sirven como fuente de inóculo de la enfermedad en el campo (Wang y Lin, 2005). Una de las principales vías de diseminación a largas distancias es a través del comercio internacional de material de propagación con infecciones asintomáticas o latentes, las cuales no producen síntomas visibles debido a la multiplicación lenta de la bacteria en los tejidos (Allen et al., 2001).

1.1.4 Mecanismos de defensa vegetal.

La respuesta de defensa de las plantas frente a los microorganismos patógenos es un proceso complejo a partir del cuál diferentes mecanismos actúan de forma coordinada. La comprensión de estos mecanismos a nivel molecular proporciona el conocimiento básico necesario para diseñar estrategias de control de enfermedades acordes a la agricultura actual y genera, a su vez, herramientas para la creación de cultivares más resistentes al estrés biótico.

El primer mecanismo de defensa de la planta se da a nivel constitutivo y abarca la existencia de barreras físicas (cutícula, tricomas, pared celular más rígida, etc.) y químicas (producción constitutiva de compuestos tóxicos o repelentes con actividad antimicrobiana como enzimas, glicoalcaloides y fitoalexinas) (Hammond-Kosack and Jones, 1996; Aoun et al., 2017). Cuando el patógeno ingresa al apoplasto vegetal, la planta lo reconoce como tal y se activan las respuestas de defensa inducibles (Boller and Felix, 2009; Lacombe et al., 2010). Existen dos niveles de respuestas inducibles en plantas, descritas como el modelo zig-zag. La primera es desencadenada por los receptores que reconocen patrones de superficie celular (PRRs) al detectar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). En ese momento se inicia la inmunidad inducida por PAMPs, también denominada PTI por su nombre en inglés (*PAMP Triggered Immunity*) (Jones and Dangl, 2006). En la PTI, receptores de la membrana plasmática de la célula vegetal (proteínas NB-LRR codificadas por los genes de resistencia, R) reconocen moléculas conservadas que pertenecen al patógeno o derivan de la acción del mismo. Los patógenos han desarrollado moléculas denominadas efectores que inhiben la PTI haciendo que se desarrolle la enfermedad. Las plantas, a su vez, han desarrollado un mecanismo de reconocimiento de estos efectores que desencadena la segunda respuesta de defensa inducible en la planta, la ETI (*Effector Triggered Immunity*). Se trata de una respuesta más rápida y fuerte que generalmente desarrolla una reacción de muerte celular a nivel localizado, conocida como respuesta de hipersensibilidad (HR) (Jones and Dangl, 2006). Esta inmunidad es patógeno específica o a veces hasta cepa específica y las proteínas encargadas del reconocimiento de los efectores son las proteínas R. Este mecanismo de resistencia se conoce tradicionalmente como la resistencia gen por gen, ya que en este caso la resistencia está dada por la interacción de una proteína codificada por un gen de avirulencia del patógeno (*avr*) que es reconocida específicamente por la proteína R de la planta (Chisholm et al., 2006; Jones and Dangl, 2006). Otra forma de resistencia llamada resistencia cuantitativa a enfermedades (QDR), está caracterizada por una

reducción más que a una ausencia de la enfermedad y es típicamente de carácter poligénico, es decir que está determinada por la acción de múltiples genes menores que contribuyen colectivamente a la resistencia. Se sabe que la QDR genera una resistencia de amplio espectro y más sostenida en el tiempo, esto hace que este tipo de resistencia sea más prevalente que la ETI en el total de plantas y cultivos. El estudio de los mecanismos moleculares de la PTI y ETI han generado información para decifrar respuestas inmunes específicas y basales, pero sobre los mecanismos moleculares de la QDR no existe mucha información disponible (Aoun et al., 2017). La QDR está controlada por múltiples genes que pueden interactuar con el ambiente y entre sí. Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que los efectos acumulativos de piramidar muchos loci QDR puede dar lugar a altos niveles de resistencia (Yasuda et al., 2016). Un punto importante es que un fenotipo resistente puede variar dentro de una población por razones que no se deben a genes que controlan la QDR. Alternativamente, una población hospedera puede contener una serie de genes R que proporcionan resistencia completa contra una cepa de un patógeno. Sin embargo, cuando se infecta con una población de patógenos altamente compleja, dicha población huésped puede exhibir una distribución continua de resistencia. Los análisis genéticos deben usarse para determinar si los niveles variables de resistencia observados se deben a QDR. Además, se debe tener cuidado con el enfoque de fenotipado utilizado para tales análisis, ya que esto puede afectar el resultado (Roux et al., 2014). Trabajos sugieren que la QDR puede resultar de la variación cuantitativa en los componentes de la PTI o ETI, así como a través de mecanismos completamente diferentes. Esto apoya la idea de la inmunidad de las plantas como una continuidad con variación cuantitativa tanto en las moléculas inductoras de los patógenos como en las respuestas del hospedero que conducen a un espectro desde susceptibilidad hasta resistencia. De acuerdo con esto, la tolerancia, la capacidad del hospedero para soportar una alta carga de patógenos con síntomas limitados de la enfermedad, parece ser un componente de la QDR en varios patosistemas, incluyendo *Arabidopsis thaliana*-*R. solanacearum* (Van der Linden et al., 2013; French et al., 2016).

1.1.5 Base genética de la resistencia a *R. solanacearum*.

En la actualidad se conoce poco acerca de los determinantes genéticos involucrados en la respuesta de defensa de la planta frente a *R. solanacearum*. La mayoría de los estudios se han realizado sobre plantas modelo como *A. thaliana* y *Medicago truncatula*, y los resultados obtenidos sugieren que la resistencia a

R. solanacearum es principalmente cuantitativa y gobernada por múltiples genes (Huet, 2014).

R. solanacearum produce al menos 94 proteínas que se inyectan en la célula de la planta (Rip), incluyendo 22 efectores conocidos (Peeters et al. 2013b; Bae et al., 2015). Hasta el momento solo se conocen 2 genes R asociados a la resistencia a la marchitez bacteriana, los cuales fueron obtenidos en estudios en *A. thaliana*. Por un lado, el par de receptores RPS4/RRS1-R, que reconoce al efector PopP2 de *R. solanacearum* e induce una respuesta del tipo ETI (Deslandes et al. 2003; Le Roux et al., 2015). En otro estudio este par de receptores se transfirió a plantas de tomate y las líneas transgénicas mostraron resistencia a *R. solanacearum* (Narusaka et al., 2013). Por otro lado, se identificó un QTL (*Quantitative Trait Loci*) en *A. thaliana* lo que condujo a la identificación del gen *ERECTA* que codifica para una quinasa de receptores NB-LRR. Su expresión limitó el crecimiento del patógeno en la planta y disminuyó los síntomas de marchitamiento (Godiard et al., 2003). Además, se demostró que otros dos efectores de *R. solanacearum*, PopP1 y AWR5, inducen una respuesta de tipo HR en petunia y tabaco, respectivamente (Lavie et al., 2002; Sole et al., 2012).

En *M. trunculata* se identificó un QTL principal que abarca varios genes R que aportaría resistencia a este patógeno (Vaillau et al., 2007; Ben et al., 2013). También se han identificado genes de resistencia en algunas plantas cultivadas. Para tomate se han realizado números estudios de mapeo, resultando en el hallazgo de 2 QTLs (Bwr-12 y Bwr-6) que contribuyen a la resistencia a *R. solanacearum* en este hospedero (Carmellie et al., 2006; Wang et al., 2013). También se han realizado estudios donde se buscan SNPs (*single-nucleotide polymorphisms*), para poder distinguir las variedades resistentes y susceptibles y de esta forma asistir a los programas de mejoramiento genético (Kim et al., 2018; Shin et al., 2019). En tomate, también se reportaron varios genes inducidos en un cultivar resistente luego de la infección por *R. solanacearum*, incluyendo genes asociados con la respuesta hormonal de la planta y la síntesis y acumulación de proteínas de resistencia en tallo (Ishihara et al., 2012). Estos hallazgos concuerdan con estudios previos que reportaron que la resistencia en tomate no se basa en evitar la colonización de las raíces, sino en la capacidad de limitar la multiplicación del patógeno a nivel del xilema (Grimault and Prior, 1993; Hikichi et al., 1999). En un estudio reciente, demostraron mediante estudios transcriptómicos, proteómicos y ensayos de inoculación, que el ciclo de la metionina y la biosíntesis del ácido γ -aminobutírico participan en la interacción planta-patógeno entre *R. solanacearum* y tomate como hospedero (Wang et al., 2019).

También se han identificado QTLs en otros cultivos, en un estudio en maní realizado sobre 195 progenies provenientes de un programa de mejoramiento, se encontró una región genómica que tiene 9 genes R candidatos a través de secuenciación del mapeo de QTLs (QTL-seq) (Luo et al., 2019). Además, Zhang et al. (2017a) generaron líneas transgénicas de tabaco con un gen NB-LRR (AHRRS5) de maní y observaron que cuando se sobreexpresó aumentó la resistencia a la marchitez bacteriana en las líneas transgénicas. En berenjena se identificó un QTL (ERS1) específico para las cepas del filotipo I, donde se encontraron 5 genes R candidatos y 2 QTLs que se asociaron a la resistencia parcial a cepas de los filotipos I, IIA y III (Salgón et al., 2017). En un estudio posterior del mismo grupo donde evaluaron 123 líneas de mejoramiento encontraron 10 QTLs específicos para cepas perteneciente al filotipo I y 3 QTLs para cepas del filotipo III (Salgón et al., 2018). Hasta el momento no hay referencias de estudios que hayan realizado mapeo de QTLs en variedades de papa. En Uruguay se han realizado estudios sobre el tipo de resistencia presente en la especie silvestre tuberosa *Solanum commersonii*, utilizada como recurso genético para la introducción de resistencia a *R. solanacearum* a través del Programa Nacional de Mejoramiento Genético de Papa que se desarrolla en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA). Los resultados obtenidos a partir de la caracterización de la progenie resultante de un cruzamiento entre dos accesiones de *S. commersonii* con diferente respuesta frente a la infección con *R. solanacearum* (susceptible x resistente), sugieren que la resistencia a *R. solanacearum* en esta especie silvestre también es cuantitativa y poligénica (González et al., 2013). También se realizaron estudios dirigidos a identificar genes involucrados en la respuesta de *S. commersonii* frente a *R. solanacearum* utilizando diferentes enfoques transcripcionales (Narancio et al., 2013; Zuluaga et al., 2015). Se identificaron varios genes diferencialmente expresados luego de la infección por *R. solanacearum*, que podrían estar involucrados en la respuesta de defensa de la planta. Estos trabajos constituyen un punto de partida fundamental para la comprensión de los mecanismos de resistencia a *R. solanacearum* aportados por esta especie silvestre.

1.1.6 Estrategias de control de la marchitez bacteriana.

La marchitez bacteriana es considerada una de las enfermedades de plantas más difícil de controlar, lo que ha posicionado a *R. solanacearum* como el segundo fitopatógeno bacteriano más importante a nivel mundial (Mansfield et al., 2012). La gran diversidad y versatilidad que caracteriza a este patógeno dificulta

el empleo de medidas universales de control. A su vez, la amplia distribución de cepas a nivel mundial, la capacidad de supervivencia del patógeno como microorganismo saprófito en el suelo y en los cursos de agua y la existencia de un gran número de especies hospederas incluyendo especies cultivadas y silvestres, contribuyen a aumentar y mantener las poblaciones del patógeno en el ambiente (Alvarez et al., 2010; Yuliar y Tokota, 2015).

Las pérdidas directas de rendimiento por *R. solanacearum* varían ampliamente según la especie hospedera, cultivar, clima, tipo de suelo, patrón de cultivo y cepa. Por ejemplo, en tomate las pérdidas de rendimiento varían de 0 a 91%, en papa de 33 a 90%, en tabaco de 10 a 30%, en banana de 80 a 100% y hasta 20% en maní (Elphinstone, 2005; Yuliar y Tokota, 2015).

Actualmente, no existe un único método de control que sea efectivo contra *R. solanacearum*. La mejor estrategia es realizar un manejo integrado combinando diferentes componentes o métodos de control. Estos métodos incluyen el uso de variedades resistentes o tolerantes, la aplicación de buenas prácticas agronómicas, así como la adopción de estrategias de control biológico y químico. Además, el uso de tubérculos-semilla certificados libres del patógeno combinado con un esquema de rotación de varios cultivos, también contribuye a limitar la presencia del patógeno (Yuliar y Tokota, 2015).

1.1.6.1 Control químico.

Los métodos basados en el uso de productos químicos, se siguen usando en algunas situaciones, pero no han tenido éxito en el control de *R. solanacearum* además de representar un riesgo potencial para el medio ambiente si el pesticida se mantiene por muchos años en el suelo y agua (Saddler, 2005; Denny, 2006). Productos químicos como algicidas (ácido 3-[3-indolil] butanoico), pesticidas (metam sodio, 1,3-dicloropropeno y clopicrina) y activadores de plantas que generan resistencia sistémica en el tomate (validamicina A y validoxilamina), han sido usados para controlar la marchitez bacteriana. La combinación de bromuro de metilo, 1,3-dicloropropeno o metam sodio con clopicrina redujo significativamente la marchitez bacteriana en el campo del 72% al 100% y aumentó el rendimiento en tabaco y tomate. El rendimiento del tomate tratado con pesticida fue de 1.7 a 2.5 veces mayor que el del control no tratado (Santos et al, 2006; Fortnum y Martin, 1998).

Por otro lado, se ha propuesto el acibenzolar-S-metilo (ASM) para inducir resistencia sistémica. La combinación de ASM y timol, que es un aceite esencial de plantas, redujo significativamente la incidencia

de la marchitez bacteriana y aumentó el rendimiento en cultivos de tomate cuando se aplicó en variedades parcialmente resistentes, mientras que en variedades susceptibles no se observó este efecto (Subedi et al., 2019). El silicio (Si) o el Si combinado con quitosano redujeron la incidencia de marchitez bacteriana a través de mecanismos de resistencia inducida. Wang et al. (2013) informaron que la resistencia mediada por Si se asoció con aumentos en la cantidad de la bacteria en el suelo, así como en la actividad enzimática del suelo (ureasa y fosfatasa ácida). Por otro lado, en un estudio reciente encontraron que la resistencia en tomate mediada por Si a *R. solanacearum* se asocia con la activación de respuestas relacionadas con la PTI y mayor resistencia a la enfermedad a través de varias vías de señalización. Estas vías están mediadas por múltiples hormonas (ácido salicílico, ácido jasmónico, etileno y auxinas) lo que produce una disminución de los efectos adversos (senescencia, déficit hídrico, salinidad y estrés oxidativo) normalmente causados por la infección de *R. solanacearum* (Jiang et al., 2019). El uso de bactericidas, antibióticos y esterilizantes también demostró ser efectivo para disminuir la población bacteriana, pero su uso es muy cuestionado porque pueden favorecer el desarrollo de cepas resistentes (Yuliar y Tokota, 2015). Se ha informado que algunos productos químicos no pesticidas suprimen la marchitez bacteriana mediante la aplicación de agentes coagulantes que capturan las células del patógeno. Varios productos químicos no pesticidas tienen el potencial de ser aplicados en el campo para controlar la enfermedad de la marchitez bacteriana porque tienen menos efectos dañinos en el medio ambiente; sin embargo, las consideraciones económicas a menudo influyen en los productos químicos seleccionados. Los productos químicos caros y las aplicaciones repetidas solo son posibles para cultivos extensivos que pueden generar pérdidas económicas sustanciales en ausencia de tratamientos. Dado que el rendimiento y la calidad del cultivo no se dañan cuando la gravedad de la enfermedad es baja o en ausencia de patógenos, un diagnóstico basado en umbrales económicos es esencial para determinar si se necesitan tratamientos químicos (Yuliar y Tokota, 2015).

Estudios previos revelaron que la aplicación de fertilizantes redujo la incidencia de la marchitez bacteriana. El calcio (Ca) es el fertilizante más conocido para suprimir la enfermedad. El aumento de las concentraciones de Ca en las plantas redujo la gravedad de la marchitez bacteriana, así como la población de *R. solanacearum* en los tallos del tomate, tabaco y en el suelo (Yamazaki y Hoshina, 1995; Yamazaki et al., 2000; Jiang et al., 2013; He et al., 2014; Liu et al., 2016). Lemaga et al. (2005) informaron que la aplicación de nitrógeno (N) + fósforo (P) + potasio (K) y N + P redujo la marchitez bacteriana y aumentó

el rendimiento en papa. Hacisalihoglu et al. (2007) informaron que el marchitamiento bacteriano indujo cambios en la distribución de nutrientes, especialmente calcio (Ca), boro (B) y P en las hojas de tomate. El tratamiento con polvo de roca también redujo efectivamente la incidencia de marchitez bacteriana en el tomate y un mayor pH del suelo y contenido de Ca fueron factores clave en el control de la marchitez bacteriana.

La degradación de la materia orgánica en el suelo puede afectar directamente la viabilidad y la supervivencia de un patógeno al restringir los nutrientes disponibles y liberar sustancias químicas naturales con propiedades inhibitorias variables. El carbono liberado durante la degradación de la materia orgánica contribuye a aumentar la actividad microbiana del suelo y, por lo tanto, aumenta la probabilidad de efectos de competencia en el suelo mejorando la capacidad de control biológico natural (Yuliar y Tokota, 2015). Se ha observado que la supervivencia de *R. solanacearum* se vio afectada por la textura del suelo y el contenido de materia orgánica, temperatura y humedad (van Elsas et al., 2000; Zhang et al., 2017b; Jiang et al., 2018). Youssef y Tartoura (2013) demostraron que diferentes materias orgánicas, como residuos de plantas, desechos animales y materia orgánica simple, disminuyeron el efecto de la marchitez bacteriana. Los posibles mecanismos de acción de los residuos vegetales se atribuyen principalmente a las actividades antimicrobianas, seguidas de la supresión indirecta del patógeno a través de la mejora de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, y por la presencia de microorganismos competidores (Cardoso et al., 2006). En el caso de los residuos animales y materia orgánica simple como aminoácidos, ácidos grasos y sacáridos, la baja supervivencia del patógeno está atribuida principalmente a la alta actividad microbiana. En contraste, la riboflavina indujo una serie de respuestas de defensa en suspensiones celulares y protegió el tabaco contra *R. solanacearum* (Liu et al., 2010). EL 3-ácido aminobutírico también aumentó la actividad de la polifenol oxidasa y disminuyó la de la catalasa en las plantas de tomate, lo que indujo una mayor resistencia a la marchitez bacteriana en el tomate (Hassan y Abo-Elyousr, 2013). Por otro lado, el uso de carbón procesado por medio de pirolisis ha demostrado reducir la marchitez bacteriana en tabaco y tomate, mejorando las propiedades fisicoquímicas del suelo, aumentado la concentración bacteriana de la rizosfera y también afectando la virulencia del patógeno (Gu et al., 2017; Zhang et al., 2017b). Los tratamientos del suelo dependen en gran medida del tipo de suelo, el medio ambiente y del material utilizado para tratar el suelo, lo que requiere un estudio específico en el lugar geográfico donde se aplique y materiales fácilmente disponibles

y económicamente viables (Yuliar y Tokota, 2015).

1.1.6.2 Rotación de cultivos.

Las buenas prácticas agronómicas, también pueden reducir la incidencia y la gravedad de la marchitez bacteriana. La rotación de cultivos con cultivos no susceptibles reduce las poblaciones de la bacteria transmitidas por el suelo (Lemaga et al., 2001). Por ejemplo, el inicio de la marchitez bacteriana se retrasó en 1 o 3 semanas y la severidad del marchitamiento se redujo en un 20–26% cuando se cultivó una variedad de tomate susceptible después del maíz o tomate resistente (Adhikari et al., 1998). La rotación del cultivo de papa con trigo, boniato, maíz, mijo, zanahorias, sorgo o porotos redujo la incidencia de la marchitez bacteriana de un 64 a 94%, mientras que el rendimiento de las papas fue de 1 a 3 veces mayor que el de las papas monocultivadas (Katafire et al., 2005).

1.1.6.3 Control biológico.

El interés en el control biológico ha aumentado debido a las preocupaciones sobre el uso masivo de productos químicos en las prácticas agrícolas. Los beneficios de los agentes de control biológico (BCA) son potencialmente autosuficientes, se diseminan por sí solos después del inóculo inicial, reducen el uso de recursos no renovables y pueden suprimir la enfermedad a largo plazo de una manera amigable con el medio ambiente. Los mecanismos empleados por los BCA se sustentan en diversas interacciones, como la competencia por nutrientes y espacio, la producción de compuestos antimicrobianos, el parasitismo, la resistencia sistémica inducida, y la producción de enzimas que degradan la pared celular y los sideróforos (Yuliar y Tokota, 2015).

Se han analizado cepas de bacterias endófitas o rizobacterias por sus actividades antibacterianas contra *R. solanacearum*. Los aislamientos de la rizosfera de plantas enfermas tuvieron un mejor desempeño en la reducción de la incidencia de enfermedad que los de plantas sanas. La eficacia de biocontrol de los microorganismos antagonistas se relacionó con las capacidades de colonización de la raíz y no con la actividad antimicrobiana *in vitro*, lo que sugiere que la capacidad de colonización de la raíz puede desempeñar un papel clave en la supresión de la enfermedad (Yuliar y Tokota, 2015).

Estudios previos mostraron el valor potencial de algunos BCA, los cuales son predominantemente cepas avirulentas de *R. solanacearum* y *Pseudomonas* spp., seguidas de *Bacillus* spp. y *Streptomyces* spp. en

el control de la marchitez bacteriana (Yuliar y Tokota, 2015; Nakahara et al., 2016; Wang et al., 2019). También se han informado BCA nuevos o poco comunes que controlan la marchitez bacteriana, como bacteriófagos o combinaciones de varios bacteriófagos (Alvarez y Biosca, 2017; Wei et al., 2017; Elhalag et al., 2018), *Pseudomonas putida* (Sun et al., 2017), *Pseudomonas mosselii* (Zhuo et al., 2019), *B. amyloliquefaciens* (Wu et al., 2017), *Acinetobacter* sp., *Burkholderia nodosa*, *Burkholderia sacchari*, *Burkholderia tericola*, *Bacillus vallismortis*, *Burkholderia pyrrocinia*, *Bacillus thuringiensis*, *Chryseobacterium daecheongense*, *Chryseobacterium indologenes*, *Chryseomonas luteola*, *Clostridium* sp., *Delftia acidovorans*, *Enterobacter* sp., *Flavobacterium johnsoniae*, *Myroides odoratimimus*, *Paenibacillus marcerans*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas brassicacearum*, *Ralstonia pickettii*, *Serratia* sp., *Sphingomonas paucimobilis*, *Staphylococcus auricularis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptomyces rochei*, *Streptomyces virginiae* y *Xenorhabdus nematophila*. Se ha informado que algunos BCA fúngicos controlan la marchitez bacteriana, como *Glomus versiforme*, *Pythium oligandrum*, *Gigaspora margarita*, *Glomus mosseae* y *Scutellospora* sp. (Yuliar y Tokota, 2015).

Algunos tratamientos exitosos involucraron combinación de diversos microorganismos y productos químicos. Por ejemplo, *Trichoderma harzianum* + *Glomus mossae* + fertilizante (Yuan et al., 2016), *Mitsuaria* sp. + *Ralstonia* sp. no patogénica (Marian et al., 2019), bactericidas + *Pseudomonas fluorescens*, bactericidas + *Bacillus subtilis*, bactericidas + *Trichoderma harzianum* (Sharma y Singh, 2018), *Acinetobacter* sp.+ *Enterobacter* sp., *Bacillus amyloliquefaciens* + *B.methylotrophicus*, *Brevibacillus brevis* + *Streptomyces roche*; *B. amyloliquefaciens* + *B. subtilis*; *Bacillus* spp. + *Pseudomonas mallei* (Yuliar y Tokota, 2015).

En un estudio donde se evaluó la comunidad microbiana de diferentes campos de tabaco afectados por *R. solanacearum*, encontraron que *Bacillus* y *Actinobacter* podrían actuar como géneros clave, reduciendo la posibilidad de invasión de patógenos transmitidos por el suelo (Yang et al., 2017).

Los BCA tienen algunas desventajas, como su bajo rendimiento debido a la colonización inconsistente, el rango acotado de plantas hospederas, el bajo nivel de reducción de la enfermedad para ser comercialmente aceptables, aplicación de inóculos de alta concentración que resultan desfavorables a nivel económico, dificultad con la producción, el almacenamiento y la posterior aplicación (Yuliar y Tokota, 2015). Sin embargo, esta es una línea de investigación y desarrollo que se ha intensificado en los últimos años a nivel mundial.

1.1.6.4 Resistencia del hospedero.

El desarrollo de cultivares resistentes a la marchitez bacteriana es uno de los métodos de control de enfermedades más efectivos, económicos y amigables con el medio ambiente. El mejoramiento por resistencia a la marchitez bacteriana se ha centrado en cultivos de gran importancia económica como el tomate, la papa, el tabaco, la berenjena, el pimiento y el maní (Boshou, 2005). La estabilidad de las variedades resistentes está altamente influenciada por las cepas del patógeno, la temperatura, la humedad del suelo, la presencia de nematodos, la interacción planta-patógeno, el método de mejoramiento aplicado y la base genética de la resistencia (Boshou, 2005; Elphinstone 2005; Wang y Lin, 2005). Por lo tanto, aumentar la resistencia varietal en el marco de un enfoque integrado puede ser el enfoque más adecuado para controlar la enfermedad (Denny, 2006).

Idealmente, las variedades resistentes deben combinar resistencia duradera con rasgos agronómicos deseables, ser capaces de enfrentar la diversidad de zonas agroecológicas donde proliferan las bacterias y la alta variabilidad genética de *R. solanacearum* (Huet et al., 2014). Se debe priorizar generar cultivares altamente resistentes para evitar la diseminación de *R. solanacearum* debido a plantas tolerantes con infecciones latentes, las cuales se caracterizan por albergar el patógeno sin mostrar síntomas de la enfermedad. Las infecciones latentes han sido reportadas en tomate, papa y maní (Ciampi and Sequeira 1980; Grimault and Prior 1993; Prior et al, 1996; Cruz et al. 2014; Huet et al., 2014).

Ayana et al. (2011) evaluaron la resistencia del tomate contra una cepa altamente agresiva de *R. solanacearum* originaria de Etiopía y encontraron 6 genotipos resistentes, 11 moderadamente resistentes, mientras que la mayoría de los genotipos, incluidos todos los cultivares de tomate comúnmente cultivados en Etiopía, eran altamente susceptibles. La transformación de un cultivar de tomate con el gen NPR1 de *A. thaliana* mejoró la resistencia a la marchitez bacteriana, reduciendo la incidencia de la enfermedad en aproximadamente un 70%, 28 días después de la inoculación (Lin et al., 2004). Líneas transgénicas de tomate transformadas con el gen del receptor del factor de elongación (EFR) de *A. thaliana* que reconoce el PAMP EF-Tu para conferir inmunidad, mostraron también reducciones significativas de la marchitez bacteriana a nivel de campo (Kunwar et al., 2018). Por otro lado, líneas transgénicas de tomate transformadas con un péptido antimicrobiano, mostraron una reducción de los síntomas de la enfermedad y una disminución de la concentración de la bacteria en el tallo (Morais et al., 2019).

En berenjena se han realizado *screenings* de resistencia en más 30 accesiones cultivadas y 40 accesiones silvestres, se encontraron varias accesiones resistentes, con resistencia moderada y susceptibles a *R. solanacearum* (Kumar et al., 2019; Namisy et al., 2019).

En papa actualmente no se dispone de un cultivar con buenos niveles de resistencia a marchitez bacteriana a nivel de campo. Se han utilizado especies de papa silvestre relacionadas con *Solanum tuberosum* como fuente de resistencia en el marco de programas de mejoramiento genético (Sequeira y Rowe, 1969; Carputo et al., 1997; Laferriere et al., 1999; González et al., 2013). La resistencia a la marchitez bacteriana se ha informado en *Solanum stenotomum* (Fock et al., 2000), *S. chacoense* (Chen et al., 2013), *S. phureja* (Sequeira y Rowe, 1969; French y De Lindo, 1982; Fock et al., 2000) y *S. commersonii* Dun (Laferriere et al., 1999; Kim-Lee et al., 2005; Carputo et al., 2009; González et al., 2013). Se obtuvieron líneas de mejoramiento entre *S. commersonii* y *S. tuberosum* con resistencia parcial a la marchitez bacteriana utilizando diferentes estrategias para superar las barreras de incompatibilidad para el cruzamiento entre ambas especies (Kim-Lee et al., 2005; Carputo et al., 2009; Guidot et al., 2009; González et al., 2013; Narancio et al., 2013). Recientemente, también se complementó la estrategia clásica de mejoramiento con la transferencia mediante transgénesis de un receptor PRR de *A. thaliana* para reforzar la defensa PTI mediada por PAMPs (Boschi et al., 2017). En este trabajo se transformaron con el receptor EFR un cultivar susceptible y una línea de mejoramiento con resistencia parcial introgresada a partir de *S. commersonii*, reportando una reducción significativa en la incidencia y severidad de los síntomas, principalmente en la línea de mejoramiento (Boschi et al., 2017).

La resistencia a la marchitez bacteriana en muchos cultivos generalmente se ha correlacionado negativamente con el rendimiento y calidad. Por lo tanto, la generación de cultivares resistentes puede ser baja debido a otros rasgos agronómicos y a que no son ampliamente aceptados por los agricultores o consumidores (Yuliar y Tokota, 2015).

1.1.6.5 Manejo integrado de la enfermedad.

Los objetivos principales del control integrado de enfermedades de plantas son (i) eliminar o reducir los inóculos iniciales, (ii) reducir la efectividad del inóculo inicial, (iii) aumentar la resistencia del hospedero, (iv) retrasar la aparición de la enfermedad y (v) enlentecer los ciclos secundarios (Agrios, 2005).

El control integrado típicamente combina dos o tres métodos, como buenas prácticas culturales, productos

químicos y BCA. Por ejemplo, la combinación de rotación de cultivos con un cultivar resistente o un tratamiento del suelo, o la combinación de materia orgánica con un producto químico no pesticida como el formaldehído o el polvo esterilizante mostraron reducir efectivamente la incidencia de marchitez bacteriana y aumento del rendimiento en papa y tomate (Adhikari et al., 1998; Sharma y Kumar, 2000; Lemaga et al., 2005; Vinh et al., 2005). La aplicación combinada de acibenzolar-S-metilo y *Pseudomonas fluorescens* Pf2 resultó en la reducción en la incidencia de marchitez bacteriana en el tomate, así como la combinación de bactericidas y *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* (Abo-Elyousr et al., 2012; Sharma y Singh, 2018). Un estudio anterior informó que la combinación de bacterias endofíticas (*Bacillus* sp. y *Serratia marcescens*) con cultivares resistentes de tomate redujo la incidencia de marchitez bacteriana (Barretti et al., 2012). Un estudio reciente mostró que la combinación de resistencia parcial en variedades de tomate y la aplicación de BCA como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas brassicacearum* y *Pseudomonas protegens* disminuyó efectivamente la marchitez bacteriana (Subedi et al., 2019).

También se ha evaluado el microbioma de la rizosfera de variedades resistentes y susceptibles de tomate y se observó que al transferir la microbiota de la rizosfera de la variedad resistente a la susceptible redujo las síntomas de la enfermedad (Kwak et al., 2018). Se deben seleccionar métodos que sean fáciles, prácticos, rentables y también ambientalmente saludables para controlar la enfermedad y mejorar los rendimientos (Yuliar y Tokota, 2015).

1.1.7 Importancia de la marchitez bacteriana de la papa.

Mansfield et al. (2012) enumeraron las diez principales especies bacterianas en función de su importancia científica y económica en las enfermedades de plantas y colocaron a *R. solanacearum* como el segundo patógeno bacteriano más importante que causa graves pérdidas en diferentes cultivos de solanáceas en diferentes partes del mundo. Elphinstone (2005) y Mansfield et al. (2012) consideraron a *R. solanacearum* como uno de los fitopatógenos más destructivos debido a su letalidad, persistencia, amplio rango de hospederos y amplia distribución geográfica en las regiones tropicales, subtropicales y templadas.

La marchitez bacteriana de la papa en regiones templadas es causada principalmente por las cepas pertenecientes al filotipo IIB-1 (raza 3/biovar 2A) (Siri et al., 2011; Gutarra et al., 2017). Además de la cepa dominante IIB-1, también se han encontrado otras cepas distintas filogenéticamente que infectan la

papa, como IIB-3, IIB-25, IIA-7, IIA-35, I-15, I-18, III-23, III-42, IV-8, IV-10 (Cellier y Prior, 2010; Hong et al., 2012; Santiago et al., 2016; Gutarra et al., 2017).

Un rasgo particular que caracteriza a las cepas IIB1 es la capacidad de producir infecciones latentes asintomáticas, debido a la multiplicación lenta de la bacteria en los tejidos. En este caso, a pesar de que la planta está infectada, la población bacteriana no alcanza los límites suficientes como para que se desarrollen los síntomas (Elphinstone et al., 1998; Swanson et al., 2005). Estas cepas se han diseminado a través de muchos países, esto fue confirmado por aislamientos de diferentes regiones que han sido comparados genéticamente y tuvieron una alta homología. Esto sugiere una propagación clonal y una difusión internacional relativamente reciente (Gutarra et al., 2017; EPPO, 2018a). Debido al riesgo potencial de propagación de este patógeno a los cultivos de papa en zonas templadas, se incluyó a las cepas IIB1 en la lista de agentes de la Ley Agrícola de 2002 sobre Bioterrorismo del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2004). Este patógeno también es considerado una bacteria de cuarentena incluida en la lista A2 de la Unión Europea desde 1992 (EPPO, 2018b).

El patógeno causa pérdidas de rendimiento considerables dependiendo de la cepa, hospedero, cultivar, clima, tipo de suelo y prácticas de cultivo. Aunque no existe información general sobre el impacto económico en todo el mundo, se han estimado pérdidas de 19 mil millones de dólares anuales solo en la papa (Elphinstone, 2005). Se han reportado pérdidas de 90 o incluso 100% en cultivos de papa en Portugal, Bangladesh, China, India, Kenia, así como importantes brotes en varios países miembros de la Unión Europea (Muthoni et al., 2012; EFSA, 2019).

Es imprescindible, en forma previa al cultivo, certificar la ausencia del patógeno en los tubérculos-semilla, uso de campos libres de patógeno, la detección prematura de plantas infectadas en los cultivos y el monitoreo de las fuentes de agua de irrigación (Priou et al., 2010; López y Biosca, 2005). Para el éxito de todas estas medidas se requiere de sistemas de diagnóstico confiables y suficientemente sensibles, que contribuyan a evitar la diseminación y propagación de la enfermedad en el cultivo. Varios organismos internacionales como la USDA (*United States Department of Agriculture*) y EPPO (*European and Mediterranean Plant Protection Organization*) han elaborado protocolos de diagnóstico de *R. solanacearum*. Los métodos recomendados incluyen: bioensayos, cultivo en medios semiselectivos, técnicas serológicas y moleculares (EPPO, 2018a).

1.1.8 Mejoramiento de papa por resistencia a *R. solanacearum* en Uruguay.

La introducción de resistencia a *R. solanacearum* en el hospedero representa un componente fundamental para alcanzar el control de la enfermedad a largo plazo (Boshou, 2005). En el caso de la papa, existen pocas fuentes de resistencia disponibles. Algunas especies silvestres han sido descritas como altamente tolerantes y por lo tanto consideradas como potenciales fuentes de resistencia en programas de mejoramiento.

La especie silvestre más valiosa disponible en Uruguay para el mejoramiento genético del cultivo de papa es *S. commersonii*. Esta especie tuberosa está ampliamente distribuida en nuestro territorio, y presenta una importante diversidad morfológica, química y genética así como importantes niveles de resistencia a *R. solanacearum* (Vázquez et al., 1997; Siri et al., 2005; Siri et al., 2011). Nuestro grupo de investigación trabaja desde el año 2000 asistiendo al Programa Nacional de Mejoramiento Genético de Papa del INIA, en la introducción de resistencia a marchitez bacteriana a partir de *S. commersonii* en nuevas variedades de papa adaptadas a las condiciones locales. La estrategia adoptada implica un esquema de introgresión basado en la utilización de *S. phureja* como especie puente para superar las barreras de incompatibilidad existente con *S. tuberosum* (González, 2010; González et al., 2013; Gaiero et al., 2017).

La ocurrencia de infecciones latentes asintomáticas es un fenómeno de gran importancia que debe ser contemplado en los programas de mejoramiento enfocados a la introducción de resistencia a *R. solanacearum* en nuevas variedades. Es necesario implementar criterios de selección de germoplasma con los mayores niveles de resistencia disponibles, y evitar así la generación de variedades tolerantes que promuevan la diseminación de la enfermedad en condiciones climáticas predisponentes (Priou et al., 2001; 2005; Huet, 2014). En el marco de mi proyecto de Licenciatura se trabajó en la optimización de un protocolo de detección molecular de *R. solanacearum* basado en un método de BIO-multiplex-PCR (Ferreira, 2012). Este método fue aplicado en el marco de esta Tesis para la detección de infección latente en plantas asintomáticas inoculadas con *R. solanacearum* provenientes del Programa de Mejoramiento de Papa del INIA. De esta forma se determina si el material vegetal seleccionado es verdaderamente resistente a la infección causada por *R. solanacearum* o si es capaz de desarrollar infecciones latentes asintomáticas que favorezcan la diseminación del patógeno.

1.2 Estructura general de esta Tesis.

El objetivo general de esta Tesis fue generar conocimiento sobre el patosistema *R. solanacearum* - *S. commersonii* para contribuir al desarrollo de cultivares de papa con resistencia a la marchitez bacteriana. Para ello, se utilizaron diferentes estrategias experimentales, desde metodologías convencionales hasta tecnologías innovadoras.

En el Capítulo 2, se presenta la evaluación de resistencia a la marchitez bacteriana en el germoplasma de papa derivado del programa de mejoramiento y la implementación de la detección de infecciones latentes sobre plantas inoculadas con el patógeno que no presentaron síntomas de marchitamiento. Las evaluaciones realizadas permitieron seleccionar genotipos con buenos niveles de resistencia que fueron utilizados como progenitores en el marco del programa de mejoramiento. Como resultado de este trabajo, también se seleccionaron genotipos con un comportamiento diferencial frente a la infección por *R. solanacearum*, sobre los cuales se profundizó en los siguientes capítulos de esta Tesis. Por otro lado, en este capítulo se construyeron y validaron cepas reporteras de *R. solanacearum* con actividad fluorescente y luminiscente, como herramientas aplicables al monitoreo del patógeno *in planta* durante el proceso de infección.

El Capítulo 3 abarca la caracterización de la interacción del patógeno con genotipos con diferentes niveles de resistencia a marchitez bacteriana. Por un lado, se presenta la aplicación de las cepas reporteras desarrolladas en el Capítulo 2 para el seguimiento del proceso de infección y colonización de la planta. El uso de la cepa luminiscente permitió realizar el seguimiento del patógeno por un método no destructivo mediante detección de luminiscencia sobre la planta entera con un luminómetro, mientras que el seguimiento con la cepa reportera fluorescente se realizó a través de la observación de cortes de tallo y raíz por microscopía confocal. Para complementar este estudio, se evaluaron respuestas de defensa de la planta inducidas luego de la infección con la bacteria en los genotipos seleccionados. Se realizaron tinciones histológicas diferenciales para evaluar la deposición de lignina, calosa, producción de especies reactivas del oxígeno y pérdida de iones a través de la membrana. Por último, se evaluó el perfil de expresión de genes candidatos involucrados en las respuestas de defensa frente a *R. solanacearum* en los genotipos seleccionados.

En el Capítulo 4, se implementó un nuevo abordaje experimental que permitió complementar la caracterización del comportamiento del patógeno en plantas con diferentes niveles de resistencia. Para

ello, se evaluó la utilización de cámaras de microfluído para el estudio de la bacteria bajo condiciones de flujo, contribuyendo con la optimización de un nuevo modelo para el estudio de este patógeno vascular. Por otro lado, se analizó la composición mineral de la savia xilemática, y diferentes tejidos de los genotipos seleccionados y se encontraron correlaciones entre la concentración de algunos minerales y el nivel de resistencia de los genotipos evaluados. A partir de estos resultados, se analizó cómo el calcio afecta el crecimiento y actividades asociadas a la virulencia de *R. solanacearum* y su influencia en los niveles de resistencia a marchitez bacteriana en papa.

Por último, en el Capítulo 5 los resultados presentados en esta Tesis fueron integrados y discutidos resaltando los avances realizados y su utilidad en la selección de futuros materiales generados en el programa de mejoramiento y el manejo integrado de la marchitez bacteriana. Se destacan también las principales conclusiones obtenidas a partir de esta Tesis y las perspectivas para futuros estudios.

CAPÍTULO 2

**Evaluación de la resistencia a la marchitez bacteriana en
germoplasma de papa y desarrollo de cepas reporteras
de *Ralstonia solanacearum* para el seguimiento del
proceso de infección**

2.1 – INTRODUCCIÓN

2.1 Introducción.

La papa (*Solanum tuberosum*) es el cultivo hortícola con mayor superficie, volumen y valor de producción en Uruguay (DIEA-MGAP, 2018). Desde la década de 1980, en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) de Uruguay se lleva adelante el programa de mejoramiento genético de papa que tiene como objetivo generar cultivares adaptados a las condiciones nacionales de producción, multiplicación de semilla y mercado local (Vilaró y González, 2017). A comienzos de la década del 2000, la producción de este cultivo se vio severamente comprometida por la ocurrencia de importantes brotes de marchitez bacteriana que afectaron a una alta proporción de explotaciones en todas las regiones de producción del país (DIEA-MGAP, 2003). En respuesta a esta situación se iniciaron por primera vez investigaciones en torno a esta problemática, en el marco de un trabajo interdisciplinario incluyendo investigadores de INIA, y de las Facultades de Agronomía y Química de la Universidad de la República. Estos trabajos permitieron determinar y caracterizar el tipo de cepas de *R. solanacearum* presentes en Uruguay, así como incluir la introducción de resistencia a marchitez bacteriana como un nuevo objetivo del programa de mejoramiento de INIA (Siri et al., 2005; 2009; 2011; Galván et al., 2007; González et al., 2013).

El uso de cultivares resistentes representa un componente fundamental para alcanzar un control efectivo de la marchitez bacteriana a largo plazo (Boshou, 2005). La resistencia en el hospedero, sumada al uso de semillas sanas y medidas de manejo preventivas constituyen la base para el control integrado de esta enfermedad. A nivel global, diversos programas de mejoramiento se han basado en la introducción de resistencia a *R. solanacearum* utilizando especies silvestres relacionadas, sin embargo, actualmente no se cuenta con ningún cultivar de papa resistente disponible comercialmente (Lopes et al., 2018).

La estrategia adoptada en Uruguay involucra la introgresión de resistencia a través de la especie silvestre *Solanum commersonii* Dun (*S. commersonii*), nativa de Uruguay, por lo que se encuentra perfectamente adaptada a nuestras condiciones ambientales. Esta especie fue anteriormente reportada como fuente de resistencia contra varios patógenos, incluyendo *R. solanacearum* (Laferriere et al. 1999; Carputo et al. 2009). Sin embargo, estos estudios partieron de un número limitado de accesiones, no contemplándose el potencial de diversidad de la especie. El número del balance del endorperma (EBN) es la barrera más importante para el cruzamiento interespecífico dentro del género *Solanum*. Según la hipótesis de Johnston et al. (1980) cada especie tiene un EBN empírico específico y para que el cruzamiento sea exitoso debe

darse una relación 2:1 del EBN materno y paterno. Esta hipótesis fue formulada para explicar el desarrollo del embrión hasta una semilla viable principalmente en cruzamientos entre especies con diferentes ploidía (Gaiero et al., 2017). Para comenzar la introgresión de resistencia a *R. solanacearum* y ampliar la base genética de las papas cultivadas en Uruguay, se utilizó una estrategia basada en la producción de gametos no reducidos (González, 2010). Esta estrategia utiliza la producción natural de gametos no reducidos en *S. commersonii* generados por una falla en la meiosis, para poder generar cruzamientos exitosos interespecíficos. Para generar cruzamientos para la introgresión de resistencia a *R. solanacearum* se utilizó la especie puente *Solanum phureja* que es diploide al igual que *S. commersonii*. Los híbridos generados en ese cruzamiento (F1), son utilizados posteriormente como germoplasma materno para dar lugar a la progenie retrocruza 1 (BC1). El programa abarca varias generaciones de selección por resistencia a marchitez bacteriana bajo condiciones controladas y retrocruzas sucesivas con germoplasma de *S. tuberosum* susceptible para restringir los caracteres desfavorables del germoplasma silvestre (Figura 2.1) (Gaiero et al., 2017).

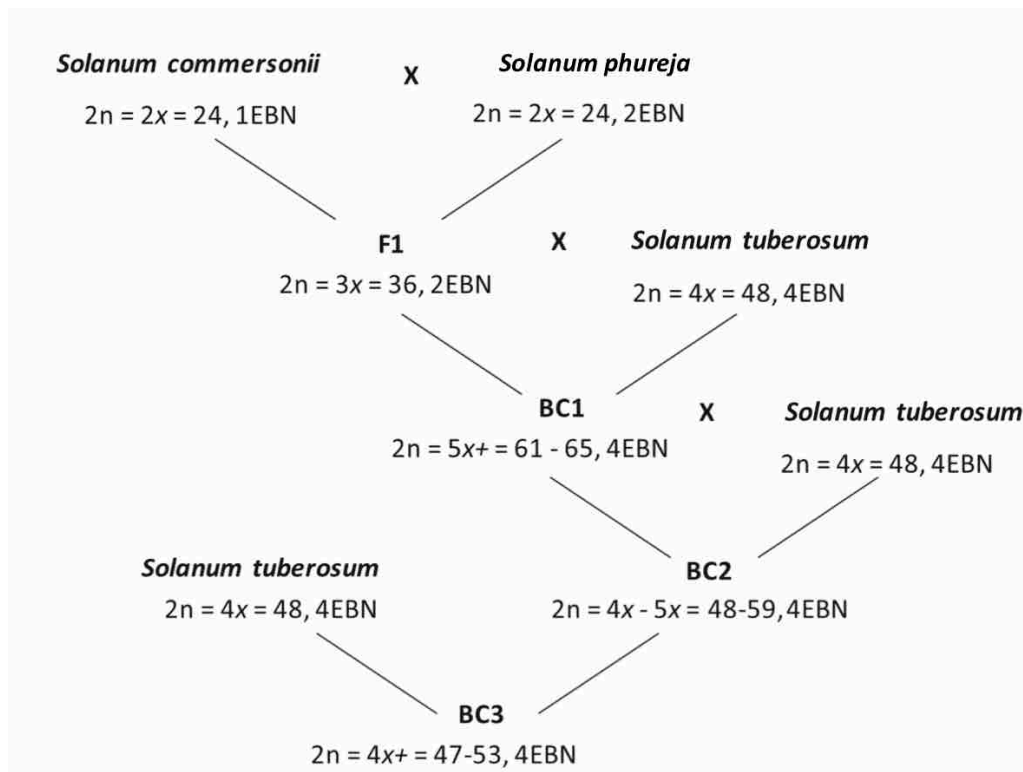


Figura 2.1. Esquema de cruzamientos del programa de mejoramiento genético de papa desarrollado en INIA para la introgresión de resistencia a *Ralstonia solanacearum* (modificado de Gaiero et al., 2017). Otro factor que se debe tener en cuenta es el riesgo de usar variedades tolerantes o con baja susceptibilidad ya que pueden enmascarar la presencia de la bacteria mediante infecciones

asintomáticas. Los genotipos inoculados con el patógeno durante los ensayos de evaluación de germoplasma, pueden no presentar síntomas de marchitamiento pero pueden albergar a la bacteria en los tallos o a nivel de los tubérculos. Para ello, fue necesario implementar criterios más exigentes de selección en los programas de mejoramiento que incluyan la detección de infección latente en plantas asintomáticas, para evitar la generación de variedades tolerantes que promuevan la diseminación de la enfermedad en condiciones climáticas predisponentes (Priou et al., 2005; Gutarra et al. 2015). En el marco de mi Tesis de Licenciatura se desarrolló un método de detección de *R. solanacearum* mediante BIO-PCR que ha demostrado presentar una elevada sensibilidad en diferentes tipos de muestras que contribuyen a la diseminación del patógeno (tallos, tubérculos y suelo). Este método permite la detección del patógeno viable, sin necesidad de realizar una etapa previa de extracción de ADN y evitando inhibidores de la amplificación por PCR (Ferreira, 2012). En el presente trabajo, se aplicó este método para la detección de infección latente por *R. solanacearum* en el germoplasma derivado del programa de mejoramiento de papa. La detección se realizó a nivel de la base del tallo, sobre plantas inoculadas con el patógeno que no presentaron síntomas de marchitamiento. Las evaluaciones realizadas permitieron seleccionar genotipos con buenos niveles de resistencia que fueron utilizados como progenitores en el marco del programa de mejoramiento de INIA. También se seleccionaron, a partir de las evaluaciones realizadas, genotipos con un comportamiento diferencial frente a la infección por *R. solanacearum*, que fueron utilizados en el marco de esta tesis para profundizar en el proceso de infección y respuestas de defensa observados (Capítulo 3).

Por otro lado, en este capítulo se presenta también la construcción y validación de cepas reporteras de *R. solanacearum* en las cuales se integró la proteína verde fluorescente (GFP) y el operón *luxCDABE* (*lux*) que codifica para la luciferasa y su sustrato. Estas herramientas, representan una alternativa simple y versátil para el monitoreo del patógeno *in vivo* durante el proceso de infección. El grupo del Dr. Marc Valls de la Universidad de Barcelona (co-tutor de este trabajo), ha desarrollado un sistema de vectores que permite la integración de cualquier construcción en un sitio permisivo del cromosoma de *R. solanacearum* de manera estable y dirigida (Monteiro et al., 2012b). En este trabajo se aplicó esta tecnología para el desarrollo de las cepas reporteras de *R. solanacearum* con actividad fluorescente y luminiscente mediante integración de los sistemas reporteros GFP y *lux* bajo el control de diferentes promotores. Para ello se seleccionó una de las cepas más agresivas de *R. solanacearum* aislada en

Uruguay, de forma de poder realizar la evaluación abarcando el máximo espectro de resistencia disponible en el germoplasma del programa de mejoramiento de papa. Se logró la introducción de la proteína GFP y del operón lux de forma estable, sin necesidad de ejercer presión selectiva para su mantenimiento en el patógeno. Además, se verificó que la virulencia del patógeno no se viera afectada por la expresión de los sistemas reporteros y se lograron niveles de fluorescencia y luminiscencia suficientes como para lograr una detección sensible de la bacteria tanto *in vitro* como *in planta*. En el Capítulo 3 de esta tesis se presenta la aplicación de estas cepas reporteras para el seguimiento del proceso de infección en genotipos con diferentes niveles de resistencia a marchitez bacteriana.

Parte de los resultados presentados en este capítulo fueron publicados en la revista *Molecular Plant-Microbe Interactions* (Cruz et al., 2014). Se adjunta el artículo completo en Anexos.

2.2 - OBJETIVOS

2.2 Objetivos.

2.2.1 Objetivo General.

Asistir al programa nacional de mejoramiento genético de papa en la selección de germoplasma con resistencia a la marchitez bacteriana y desarrollar herramientas para el seguimiento del proceso de infección en genotipos seleccionados.

2.2.2 Objetivos Específicos.

- Evaluar la resistencia a la marchitez bacteriana en el germoplasma generado en el programa nacional de mejoramiento genético de papa mediante ensayos de inoculación en suelo.
- Determinar la ocurrencia de infecciones latentes en genotipos asintomáticos.
- Construir cepas reporteras de *R. solanacearum* como herramientas útiles para evaluar el proceso de colonización y establecimiento de infecciones latentes.
- Validar las cepas reporteras construidas, verificando que la integración del sistema reportero no afecta la virulencia del patógeno y que la emisión del sistema reportero es detectada tanto *in vitro* como *in planta*.
- Seleccionar genotipos con diferentes niveles de resistencia frente a la infección con *R. solanacearum* para futuros estudios de interacción planta-patógeno.

2.3 - MATERIALES Y MÉTODOS

2.3 Materiales y Métodos.

2.3.1 Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento.

Los ensayos de inoculación para las evaluaciones de resistencia fueron realizados con una cepa de *R. solanacearum* perteneciente al filotipo IIB, secuevar 1 (IIB-1) aislada en San José en el año 2003 (cepa UY031) (Siri et al., 2011). Esta cepa fue seleccionada por su alta agresividad en diferentes hospederos (papa, tomate) y actualmente se cuenta con su secuencia genómica completa (Guarisch-Sousa et al., 2016). Previo a cada ensayo, se partió de un cultivo stock mantenido a -70°C utilizando glicerol al 18% como crioprotector, el cual fue sembrado en placas de medio Phi con cloruro de trifenil-tetrazolio (TTC) (Kelman, 1954) incubadas a 28°C durante 72 h. Posteriormente, se realizó un subcultivo partiendo de una colonia aislada con morfología típica de *R. solanacearum* (colonia mucosa, irregular, de color blanco y con el centro rojo), incubando con agitación a 150 rpm en medio Phi sin tetrazolio a 28°C durante 24 h. El cultivo de *R. solanacearum* también se realizó en medio mínimo suplementado con una fuente de carbono (20 mM L-glutamato, 0,2% de glucosa o 2% de glicerol) (Boucher et al. 1985; Monteiro et al. 2012a; Khokhani et al., 2017). Para seleccionar y cultivar a las cepas reporteras de *R. solanacearum* se utilizaron los antibióticos tetraciclina (10 µg/ml y 5 µg/ml en cultivo sólido y líquido respectivamente) y gentamicina (75 µg/ml y 5 µg/ml en cultivo sólido y líquido respectivamente). Para la construcción de los vectores utilizados en este trabajo se utilizó una cepa de *Escherichia coli* (*Mach1*, Life Technologies), la cual fue cultivada en medio líquido o en placas de medio Luria Bertoni (LB) (Sambrook et al., 2000), incubando a 37 °C durante 24 h. Las concentraciones bacterianas fueron monitoreadas midiendo la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀ de 0,1 corresponde a 10⁸ ufc/ml para *R. solanacearum*). Para la detección de infecciones latentes en plantas inoculadas mediante BIO-PCR se realizó una etapa de cultivo en placas de medio selectivo para *R. solanacearum* mSMSA (Elphinstone et al., 1996). La composición y forma de preparación de estos medios se detalla en el Apéndice 1.

2.3.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Se evaluaron 854 genotipos derivados del programa nacional de mejoramiento genético de papa de INIA. En cada ensayo de inoculación se utilizaron plantas de *S. tuberosum* cultivar Chieftain (cv. Chieftain) como control susceptible. Los materiales evaluados se detallan en la Tabla 2.2 e incluyen: i) accesiones

silvestres de *S. commersonii*, *S. chacoense* y *S. malmeanum* obtenidas en colectas previas del grupo en diferentes regiones del país, ii) cultivares comerciales y materiales de referencia de otros programas de mejoramiento, iii) progenies obtenidas a partir de cruzamientos anuales interspecíficos basados en el esquema de introgresión de resistencia a partir de *S. commersonii* (Figura 2.1). Estos materiales integran la colección de germoplasma mantenida bajo condiciones *in vitro* en la Unidad de Biotecnología de INIA (Las Brujas). Los genotipos fueron introducidos a partir de las semillas producidas por los frutos generados por la planta progenitora. Para ello, las semillas se trataron durante 24 h con ácido giberélico (1 mg/l) utilizado para promover el crecimiento vegetal. Luego, se trataron con solución desinfectante (1/3 hipoclorito, 2/3 de *tween*) durante 10 min, y se realizaron sucesivos lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, se pasaron aproximadamente 15 semillas de cada genotipo a una placa de Petri estéril, se sellaron las placas con *parafilm* y se dejaron en lugar oscuro hasta su germinación (entre 7-20 días). Las semillas germinadas se transfirieron a tubos de vidrio con medio papa multiplicación (Apéndice 1) y se incubaron aproximadamente 3 semanas hasta elongación y generación de varios entrenudos. Previo a cada ensayo, se realizó la micro-propagación de los genotipos a evaluar mediante cultivo *in vitro* a partir de un nodo en frascos de vidrio con medio papa multiplicación suplementado con 30g sacarosa/litro (Apéndice 1) (Roca et al., 1978). Los frascos se incubaron a 22°C con ciclos de 16 horas luz/8 horas de oscuridad durante 3-4 semanas (Figura 2.2-A). Posteriormente, para la evaluación de resistencia a *R. solanacearum*, las plantas fueron transferidas a almacigueras de celdas de 5-cm³ con sustrato hortícola comercial (TREF) y mantenidas por 2 semanas en invernadero para un mayor crecimiento y aclimatación (Figura 2.2-B). Finalmente, las plantas fueron colocadas en una cámara de crecimiento a 24°C y 65% de humedad con un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas de oscuridad para la realización de los ensayos de inoculación (Figura 2.2-C). Para la evaluación de la emisión de fluorescencia y luminiscencia *in planta* generada por las cepas reporteras de *R. solanacearum*, las plantas fueron transferidas a macetas de 170-cm³ (Figura 2.2-D) luego de la etapa de crecimiento en almacigueras en invernadero, y posteriormente fueron colocadas en la cámara de crecimiento antes descrita para los ensayos de inoculación. En los experimentos con las cepas reporteras fueron utilizadas plantas de cv. Chieftain como control susceptible y dos genotipos provenientes del programa de mejoramiento genético de papa obtenidos a partir de cruzamientos entre dos accesiones de *S. commersonii* con diferentes niveles de resistencia a *R. solanacearum* (F97: susceptible y F118: parcialmente resistente).

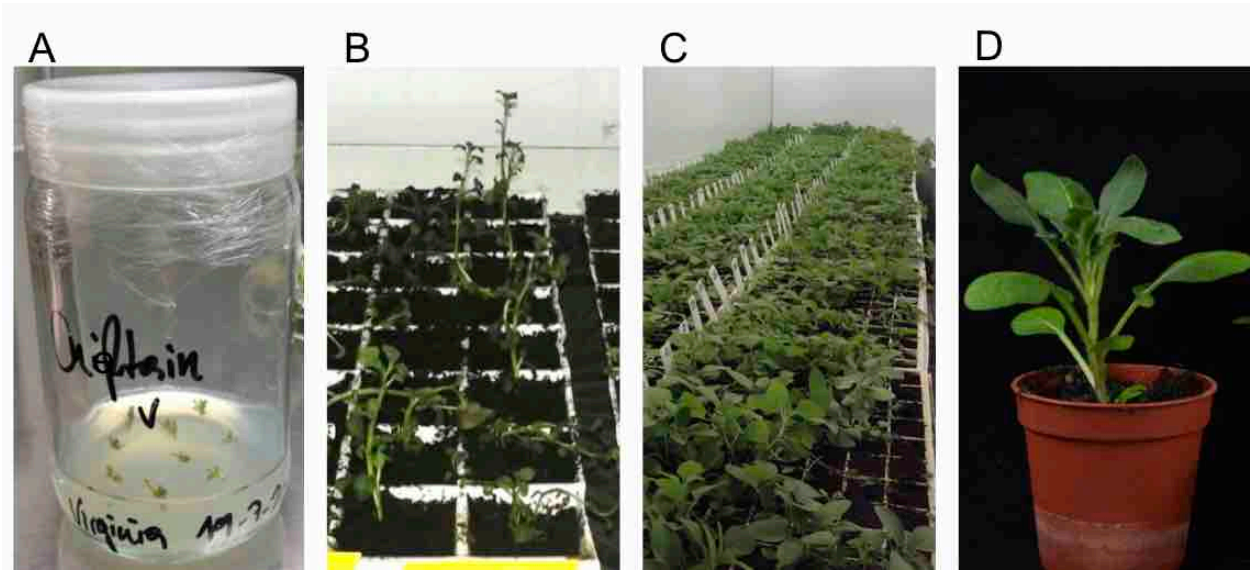


Figura 2.2. Cultivo de genotipos del programa nacional de mejoramiento de papa para ensayos de inoculación con *Ralstonia solanacearum*. **A:** Nodos recién cortados para la multiplicación *in vitro* de plantas en medio papa multiplicación. **B:** Plantas transferidas a almacigueras con sustrato hortícola para aclimatación en invernadero. **C:** Disposición de plantas aclimatadas en cámara de crecimiento para ensayos de evaluación de resistencia. **D:** Plantas crecidas en macetas utilizadas en los experimentos realizados con las cepas reporteras.

2.3.3 Evaluación de resistencia a la marchitez bacteriana.

2.3.3.1 Ensayos de inoculación.

Se realizaron 2-3 ensayos de evaluación de resistencia anuales durante el período 2011-2015. Los materiales incluidos en cada ensayo fueron seleccionados por el Ing. Agr. Francisco Vilaró, en el marco del programa nacional de mejoramiento de papa de INIA. Para todos los ensayos se utilizaron plantas crecidas en almacigueras de celdas de 5-cm³ (Figura 2.2). Se suspendió el regado de las almacigueras 1-2 días previos a la inoculación para asegurar que la suspensión de inoculación sea retenida por el sustrato hortícola. Para la inoculación, se preparó una suspensión de células de la cepa de *R. solanacearum* UY031 en suero fisiológico estéril a partir de un cultivo de la bacteria crecido durante 48 h en agitación en medio Phi con TTC (Kelman, 1954). La suspensión se ajustó espectrofotométricamente a una concentración de 10⁸ ufc/ml (OD₆₀₀=0.1) y posteriormente se realizó una dilución al décimo para llegar a una concentración de inóculo de 10⁷ ufc/ml. Previo a la inoculación, se dañaron las raíces realizando un orificio de unos 2 cm de profundidad con un tip descartable estéril y se inocularon las plantas con 1 ml de la suspensión bacteriana (González et al., 2013). Posteriormente las plantas fueron incubadas en una

cámara de crecimiento a 28°C y 65% de humedad con un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas de oscuridad. Se evaluaron los síntomas de marchitamiento periódicamente hasta los 28 días posteriores a la inoculación (dpi) siguiendo la escala de 0 (planta asintomática) a 4 (planta muerta, todas las hojas marchitas). Se utilizaron 16 réplicas de cada genotipo y en cada experimento se inocularon plantas con suero fisiológico estéril como control negativo. Se calculó el área bajo la curva de evolución de la enfermedad (AUDPC) y la proporción de plantas marchitas sobre el total de 16 plantas inoculadas a los 28 dpi (P_m) para cada genotipo. Los materiales con mayores niveles de resistencia al marchitamiento seleccionados anualmente fueron incluidos en ensayos posteriores a los efectos de confirmar el tipo de respuesta observado.

2.3.3.2. Detección de infecciones latentes.

Se realizó la detección de infección latente en los genotipos con mayores niveles de resistencia al marchitamiento. Se seleccionaron los genotipos que presentaron una menor proporción de plantas marchitas luego de 28 días de inoculación ($P_m \leq 5/16$). Para cada genotipo seleccionado se tomaron muestras de tallos de todas las plantas asintomáticas, los cuales se lavaron con agua corriente primero y luego utilizando un bisturí previamente desinfectado se cortaron fragmentos del tallo de 1-2 cm en la zona basal. Las muestras de un mismo genotipo se agruparon, se desinfectaron con hipoclorito 1% durante 1 min, se lavaron con agua destilada estéril durante 1 min, se secaron con papel absorbente estéril y se colocaron en una bolsa de plástico estéril. Los tallos se suspendieron en un volumen suficiente de *buffer* de extracción (10 ml por gramo de tejido) (Anonymous, 2006) (Apéndice 2), y se procesaron en un homogeneizador (Seward, Stomaker400) durante 10 min a máxima velocidad.

La detección del patógeno se realizó mediante BIO-PCR siguiendo un procedimiento previamente optimizado para la detección de todo el complejo de especies de *R. solanacearum* y específicamente de las cepas IIB-1 en muestras de plantas, tubérculos y suelo (Ferreira, 2012). Para ello, 100 μ l del extracto vegetal se colocaron en 2 placas de medio selectivo mSMSA y se incubaron a 28°C. Luego de 48 h una de las placas de mSMSA fue lavada con 2 ml de agua estéril, el lavado se centrifugó a 8000 rpm (centrifuga Thermo, Legend Micro 17 R) durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el *pellet* obtenido se resuspendió en 100 μ l de suero fisiológico estéril. Posteriormente, se provocó la lisis de las células por

calentamiento durante 20 min a 99°C y se realizó la amplificación por multiplex-PCR a partir de 5 µl del lisado (las condiciones de la multiplex-PCR y los *primers* utilizados se detallan en el Apéndice 3). Todas las reacciones se realizaron por duplicado y en cada corrida se incluyeron controles positivos (ADN genómico de la cepa UY031) y negativos (agua). El resultado de la amplificación se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% utilizando *buffer* TBE 0,5X (Apéndice 2) y 100 mV de voltaje. Se sembraron 5 µl del producto de PCR de cada muestra y 2 µl de marcador de peso molecular (Smart Ladder, Eurogenetec, 1-Kb). El tamaño del producto de amplificación esperado para las cepas IIB-1 es 448 pb y para todas las cepas de *R. solanacearum* un fragmento de 280 pb.

La otra placa de mSMSA se siguió incubando a 28°C durante 7 días para observar el desarrollo de colonias típicas de *R. solanacearum* y determinar la concentración del patógeno mediante el conteo de colonias.

2.3.4 Desarrollo de cepas reporteras.

2.3.4.1 Construcción de vectores con los sistemas reporteros.

Para la generación de cepas reporteras de *R. solanacearum* con actividad fluorescente y luminiscente se utilizaron los vectores pRC que contenían los sistemas reporteros GFPuv y lux (operón *LuxCDABE*), acoplados a diferentes promotores y un marcador de selección por resistencia a gentamicina.

Por un lado, en el marco de este trabajo se realizaron las construcciones de vectores conteniendo estos sistemas reporteros bajo el control de un promotor constitutivo de cloroplasto *PpsbA* (promotor constitutivo del cloroplasto de *Amaranthus hybridus*). Para ello, el promotor *PpsbA* se amplificó a partir del plásmido pDSK-GFPuv (Wang et al. 2007) con *primers* que agregaron sitios de restricción para las enzimas *AvrII* y *KpnI* a los lados de la secuencia del promotor. Este fragmento fue clonado dentro del plásmido pGEM-T-EASY (Life Technologies) dando lugar al plásmido pG-Pps. Posteriormente, el promotor *PpsbA* fue escindido del plásmido pG-Pps y clonado dentro del plásmido pRCG-GWY (Monteiro et al. 2012b), utilizando las mismas enzimas de restricción y dando lugar al pRCG-Pps-GWY. Finalmente, para agregar los sistemas reporteros, el operón lux fue escindido del plásmido pRCG-Pep-lux (Monteiro et al. 2012b), utilizando las enzimas de restricción *SfiI* y *KpnI* y clonado en los mismos sitios en pRCG-Pps-GWY. De esta forma, se obtuvo el vector pRCG-Pps-lux conteniendo la fusión reportera *PpsbA::LuxCDABE* y un gen de resistencia a gentamicina (Figura 2.3). Estos elementos a su vez se encuentran flanqueados por

secuencias homólogas al genoma de la cepa GMI1000 de *R. pseudosolanacearum* que permiten la integración del plásmido mediante doble recombinación homóloga en un sitio permisivo del genoma (Monteiro et al. 2012b). El vector pRCG-Pps-GFP conteniendo la fusión *PpsbA::GFPuv* (Figura 2.3) fue creado de forma análoga mediante el clonado del gen reportero a partir del plásmido pG-GFPuv (Monteiro et al. 2012b) utilizando las enzimas *KpnI* y *BglII*. Las amplificaciones fueron realizadas con la ADN polimerasa *Pfx* de alta fidelidad (Life Technologies) siguiendo las indicaciones del fabricante. Todos los plásmidos utilizados en este trabajo se encontraban almacenados en cepas de *Escherichia coli* competentes MACH 1. Las purificaciones de plásmidos se realizaron utilizando el kit comercial ExpresTM Plasmid (GeneAll Biotechnology). Luego de las digestiones se realizaron electroforesis con geles de agarosa 1% para poder obtener los fragmentos de interés de cada plásmido, realizando la purificación de las bandas con un kit comercial (ExpinTM Combo, GeneAll Biotechnology). Las ligaciones se realizaron con T4 ADN ligasa (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Por otro lado, se trabajó con los vectores pRCG-Pep-GFP y pRCG-Pep-lux, obtenidos en trabajos previos (Monteiro et al., 2012b). Estos vectores contienen los mismos sistemas reporteros pero acoplados al promotor Peps (promotor que dirige la expresión del operón involucrado en la síntesis del polisacárido extracelular de *R. solanacearum*).

2.3.4.2 Integración de los sistemas reporteros en el genoma de *R. solanacearum* UY031.

La integración de los sistemas reporteros GFPuv y lux en la cepa de *R. solanacearum* UY031 se realizó a través del sistema de vectores pRC/pCOMP (Monteiro et al., 2012b) (Figura 2.3).

Los vectores pRC están diseñados para su integración en cepas de *R. pseudosolanacearum* del filotipo I, por lo cual fue necesario utilizar otro vector (pCOMP-PhII) para poder integrar las fusiones reporteras contenidas en los vectores pRC en la cepa de *R. solanacearum* UY031 perteneciente al filotipo II. Por lo tanto, la integración de los sistemas reporteros se realizó mediante un proceso de dos etapas. En una primera etapa se integró el vector pCOMP-PhII (Monteiro et al., 2012b) en la cepa UY031 mediante transformación natural (Boucher et al., 1985). Esta integración se realizó mediante un evento de doble recombinación homóloga a través de las secuencias UW551-A y UW551-B presentes en una región permisiva del genoma de las cepas pertenecientes al filotipo II (Monteiro et al., 2012b). Como resultado,

se obtuvo la cepa recombinante UY031-COMP, que se seleccionó por resistencia a tetraciclina y que contiene las regiones GMI1000-1 y GMI1000-2.

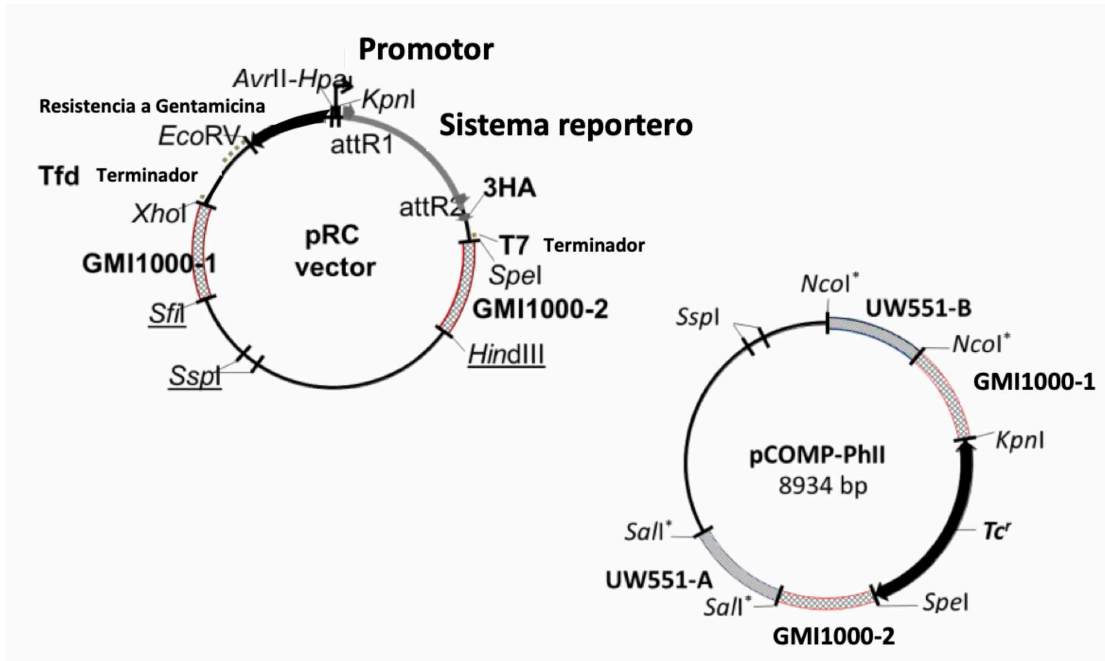


Figura 2.3. Sistema de vectores utilizados para la construcción de cepas reporteras a partir de la cepa de *Ralstonia solanacearum* UY031 (adaptado de Monteiro et al., 2012b). Vector pRC: vector diseñado para las cepas de *R. pseudosolanacearum* pertenecientes al filotipo I (GMI1000). Vector pCOMP-PhII: vector utilizado como adaptador genético para las cepas de *R. solanacearum* pertenecientes al filotipo II.

Sobre esta cepa se realizó una segunda ronda de transformación natural para integrar por doble recombinación homóloga los sistemas reporteros contenidos en los plásmidos pRC detallados previamente, seleccionando las cepas recombinantes por resistencia a gentamicina.

En la Tabla 2.1 se detallan los vectores utilizados en esta última etapa de transformación y las cepas reporteras de *R. solanacearum* UY031 generadas conteniendo los sistemas reporteros GFPuv y el operón lux acoplados a los promotores *PpsbA* y *Peps*. Previo a las transformaciones naturales los vectores fueron linealizados mediante digestión con una enzima de restricción (*SspI* para pCOMP-PhII, *HindIII* para pRCG-Pep-GFP y pRCG-Pps-GFP y *SfiI* para pRCG-Pep-lux y pRCG-Pps-lux). En el apéndice 5 se describen todos los vectores utilizados en este trabajo.

Tabla 2.1. Desarrollo de cepas reporteras de *Ralstonia solanacearum* con actividad fluorescente y luminiscente.

Vector	Promotor	Sistema reportero	Cepa reportera ^a
pRCG-Pep-GFP ^b	<i>Peps</i>	GFPuv	UY031 Pep-GFP
pRCG-Pep-lux ^b	<i>Peps</i>	Lux	UY031 Pep-lux
pRCG-Pps-GFP	<i>PpsbA</i>	GFPuv	UY031 Pps-GFP
pRCG-Pps-lux	<i>PpsbA</i>	Lux	UY031 Pps-lux

^aCepas reporteras de *R. solanacearum* obtenidas por transformación natural de la cepa UY031-COMP con cada uno de los plásmidos construidos. ^b Plásmidos construidos por F. Monteiro (Monteiro et al., 2012b).

2.3.5 Validación de las cepas reporteras.

2.3.5.1 Verificación de integraciones mediante PCR.

Se confirmó mediante amplificación por PCR la correcta integración de los sistemas reporteros en las cepas desarrolladas. Para cada sistema se seleccionaron a partir de la placa de transformación, varias colonias resistentes a gentamicina y con morfología característica de *R. solanacearum* para su posterior verificación. Para ello se utilizaron *primers* dirigidos a la zona de integración dentro del genoma de *R. solanacearum*. Las reacciones se llevaron a cabo en una mezcla de 25 µl conteniendo de 10-100 ng de ADN cada cepa analizada, 0,2 mM de cada uno de los cuatro dNTP, 0,4 µM del *primer forward* 5'-CGGACGGTGCTCGCACGATTAC-3' y 0,4 µM del *primer reverse* 5'-ACTTTCAACAGTTTCAGCGGAGTGAGA-3', 2,5 U de *Taq* ADN polimerasa para fragmentos largos (Fermentas) y el *buffer* proporcionado por el fabricante. La amplificación se realizó en un termociclador de gradiente Corbett CG1-96 (Qiagen) con el siguiente programa de temperaturas: un primer paso de desnaturalización a 94°C por 5 min; 35 ciclos repetidos de desnaturalización a 94°C por 20 seg, hibridación a 63°C por 30 seg y extensión a 68°C por 2 min; una etapa final de extensión a 68°C por 10 min. El resultado de la amplificación se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando *buffer* TBE 0,5X (Apéndice 2) y 100 mV de voltaje. Se sembraron 2 µl del producto de PCR de cada muestra y 2 µl de marcador de peso molecular (Smart Ladder, Eurogenetec, 1-Kb). El tamaño del producto de amplificación esperado es 2000 pb.

2.3.5.2 Evaluación de la virulencia de las cepas reporteras desarrolladas.

Para la evaluación de la virulencia se utilizaron plantas de cv. Chieftain y de *S. commersonii* (genotipo F118). Se siguió el procedimiento descrito previamente para la propagación y crecimiento de las plantas (2.3.2), las cuales se dispusieron en macetas de 170-cm³. Para la inoculación, se preparó una suspensión de células de las cepas reporteras de *R. solanacearum* UY031 en suero fisiológico estéril a partir de un cultivo crecido durante la noche en medio Phi con TTC y gentamicina (Kelman, 1954). Se preparó una suspensión ajustada a 10⁷ ufc/ml, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (2.3.3.1). Previo a la inoculación, se dañaron ligeramente las raíces realizando tres orificios de unos 2 cm de profundidad con un *tip* descartable estéril y se inocularon las plantas con 40 ml de la suspensión bacteriana en cada maceta. Luego de la inoculación las plantas fueron mantenidas en cámara de crecimiento a 28°C y 65% de humedad con un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas de oscuridad.

Se realizaron dos ensayos de inoculación independientes, con un total de 8 plantas de cv. Chieftain y 8 plantas de *S. commersonii* (genotipo F118, parcialmente resistente) inoculadas con cada una de las cepas desarrolladas y con la cepa control UY031 sin transformar. En cada ensayo se incluyeron también plantas control inoculadas con suero fisiológico estéril. Las plantas fueron distribuidas siguiendo un diseño aleatorio completamente al azar. Se registraron los síntomas de la enfermedad diariamente hasta 15 dpi utilizando la misma escala que fue descrita en el apartado 2.3.3.1.y se calculó la virulencia de cada cepa en función del valor de AUDPC.

2.3.5.3 Evaluación de la emisión de fluorescencia y luminiscencia *in vitro*.

Para evaluar la emisión de fluorescencia de las cepas desarrolladas se realizó una curva de crecimiento en medio mínimo de las cepas de *R. solanacearum* UY031, UY031 Pps-GFP y UY031 Pep-GFP. Para ello, se partió de un precultivo de 24 h de cada cepa en medio Phi (Kelman, 1954) y se ajustó la concentración a OD₆₀₀=0,5. De esta suspensión se tomaron 2 ml que se inocularon en 100 ml de medio mínimo. Los cultivos se incubaron a 28°C con agitación a 150 rpm y se realizaron determinaciones periódicas de la concentración bacteriana (OD₆₀₀) y de los niveles de fluorescencia utilizando fluorímetro (Shimadzu, RF-5301 PC). Las medidas de fluorescencia están expresadas en unidades relativas de fluorescencia (RFU) y el nivel de fluorescencia emitida por la cepa sin transformar fue 20 RFU. Cada cepa se analizó por triplicado.

Para evaluar la intensidad de luminiscencia *in vitro* de las cepas con el sistema reportero lux se partió de un precultivo de 24 h de las cepas UY031, UY031 Pep-lux y UY031 Pps-lux en medio Phi (Kelman, 1954) que se suspendió en medio mínimo ajustando la concentración a $OD_{600}=1,0$ (10^9 ufc/ml). Luego se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta llegar a una concentración de 10^5 ufc/ml. Los niveles de luminiscencia se detectaron utilizando luminómetro de placas (*Thermo ScientificTM, LuminoskanTM Ascent*). Para las determinaciones se utilizaron placas de 96 pocillos preparadas para cultivo celular y que evitan el pasaje de luz entre los pocillos (Greiner). Las medidas de luminiscencia están expresadas en unidades relativas de luminiscencia (RLU) y el nivel de luminiscencia emitida por la cepa sin transformar en luminómetro de placas fue 0,0008 RLU. Por otro lado, también se cuantificó la emisión de luminiscencia en luminómetro de tubo para la cepa UY031 Pps-lux (Berthold, FB12). La preparación de los cultivos fue igual a la detallada anteriormente, pero las diluciones se realizaron en agua destilada estéril en lugar de en medio mínimo. El nivel de luminiscencia basal emitido por la cepa sin transformar en luminómetro de tubos fue de 30 RLU.

2.3.5.4 Evaluación de la emisión de fluorescencia y luminiscencia *in planta*.

Para verificar la actividad de las cepas reporteras fluorescentes *in planta*, se infectaron genotipos con diferentes niveles de resistencia y se realizaron observaciones de cortes vegetales mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal.

En una primera instancia, se evaluaron plantas inoculadas a nivel del pecíolo con 10 μ l de una suspensión ajustada a 10^7 ufc/ml (Siri et al., 2011). Luego de 5-7 días se realizaron cortes transversales a diferentes alturas del tallo de cada planta y se observaron con microscopio de epifluorescencia (Zeiss, Axio phot; Nikon, Eclipse 80i) con filtro DAPI UV-Visible. Estos experimentos se realizaron con la cepa UY031 Pep-GFP inoculando dos genotipos de *S. commersonii* F97 y F118.

En una etapa posterior, se incorporó el seguimiento de las plantas inoculadas mediante la observación de cortes por microscopía confocal de fluorescencia. Para estos experimentos se inocularon plantas de cv. Chieftain y del genotipo 11201.27 (parcialmente resistente) con la cepa UY031-Pps-GFP. Las inoculaciones se realizaron en suelo según los procedimientos descritos anteriormente y se realizaron cortes transversales de tallo y cortes de fragmentos de raíz de cada planta luego de 2 a 22 días. Dado que el modelo de microscopio confocal utilizado en este trabajo es invertido fue necesario construir

cámaras para contener los cortes de tejido. Se ensayaron diversos medios de inmersión para la realización de las observaciones: PBS/agua (70:30), glicerol (80%), PVA-DABCO (25% 1,4-diazabicyclooctano, 10% alcohol polivinílico, 5% glicerol, 25 mM tris *buffer* y agarosa (1%), para lograr que las muestras no se deshidraten y a su vez que la bacteria se disemine lo mínimo posible del corte de tejido donde se encontraba. También se evaluó el uso vaselina sólida y cinta aisladora como posibles contenedores para el medio de inmersión. Las observaciones se realizaron en un equipo Leica (TCS-SP₅), utilizando un láser con una longitud de onda de excitación de 405 nm (UV) y otro con 543 nm (visible).

Para la evaluación de la actividad *in planta* de las cepas reporteras luminiscentes, plantas de *S. commersonii* (genotipos F97 y F118) se inocularon en suelo como fue descrito en el apartado 2.3.5.2. Las plantas fueron visualizadas diariamente utilizando un luminómetro LAS4000 (Fuji Film) con el modo para detectar quimioluminiscencia, con un tiempo de exposición incremental de 2 min y una sensibilidad/resolución seteada en *high binning*. Dado que esta técnica no es destructiva, las mismas plantas pudieron ser evaluadas de forma periódica hasta su muerte. Por otro lado, al final del ensayo la luminiscencia fue cuantificada en cada planta mediante un método destructivo, donde se cortaron fragmentos de 1-cm de tallo y raíz por encima y por debajo del suelo y se midió la luminiscencia de los fragmentos utilizando un luminómetro de tubo (Berthold, FB12). Cada muestra fue lavada y pesada previamente y la luminiscencia fue expresada en RLU/mg de tejido. Se midió la luminiscencia en plantas inoculadas con la cepa de *R. solanacearum* UY031 sin transformar para obtener el valor de luminiscencia basal.

Previo a la cuantificación de luminiscencia *in planta* se verificó la correlación entre la emisión de luminiscencia y la concentración bacteriana dentro de la planta. Para ello, se inocularon plantas en suelo como fue descrito en el apartado 2.3.5.2, luego se tomaron fragmentos de tallo que mostraron diferente nivel de luminiscencia y se maceraron en agua estéril. Posteriormente, se midió la luminiscencia del extracto en luminómetro de tubo (Berthold, FB12) y se plaquearon varias diluciones en medio selectivo mSMSA para obtener las ufc/ml.

En todos los ensayos de inoculación con las cepas reporteras desarrolladas se incluyeron 3-10 réplicas biológicas por tratamiento y en cada experimento se inocularon plantas con suero fisiológico estéril como control negativo.

2.3.6 Análisis estadístico.

Para analizar el AUDPC, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y el test de comparación múltiple con el índice de Tukey's con 95% de confianza. El modelo residual fue usado para chequear la distribución normal de los datos y que las varianzas analizadas fueran homogéneas. Los valores de los replicados de los tratamientos en ensayos independientes fueron combinados cuando no hubo diferencias significativas entre ellos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2009).

2.4 - RESULTADOS

2.4 Resultados.

2.4.1 Evaluación de resistencia a *Ralstonia solanacearum* en germoplasma del programa de mejoramiento genético de papa (INIA).

Durante este trabajo se evaluaron un total de 854 genotipos, incluyendo germoplasma silvestre de *S. commersonii*, así como materiales avanzados obtenidos en cruzamientos realizados anualmente en el marco del programa nacional de mejoramiento genético de papa de INIA. Se evaluaron los síntomas de la enfermedad y se calculó la proporción de plantas marchitas sobre el total de plantas inoculadas para cada genotipo (Tabla 2.2).

El *screening* realizado permitió identificar 71 genotipos con niveles altos de resistencia ($P_m \leq 5/16$) al marchitamiento causado por *R. solanacearum* en nuestras condiciones de inoculación, lo que representa un 8,3% de los materiales evaluados (Figura 2.4). Algunos de estos materiales seleccionados anualmente fueron utilizados como progenitores en las sucesivas retrocruzas con *S. tuberosum* siguiendo el esquema propuesto para la introgresión de resistencia a marchitez bacteriana a partir de la especie silvestre *S. commersonii* (Figura 2.1). La mayoría de los genotipos que mostraron altos niveles de resistencia pertenecen a las generaciones F1 y BC1. Esto era de esperar, ya que en generaciones posteriores estos materiales son cruzados con progenitores susceptibles de *S. tuberosum*. Sin embargo, es de destacar que también fue posible mantener altos niveles de resistencia en algunos genotipos pertenecientes a generaciones más avanzadas.

Además de la selección en base a la evaluación de síntomas de marchitamiento, en este trabajo se incorporó la detección de infección latente sobre los genotipos seleccionados siguiendo un procedimiento de BIO-PCR previamente optimizado. Este método implica una etapa de multiplicación del patógeno en un medio selectivo para *R. solanacearum* previo a la amplificación por PCR. De esta forma, se aumenta mucho la sensibilidad, permitiendo detectar al patógeno en plantas infectadas con hasta 100 ufc/g de tejido vegetal (Ferreira, 2012). Los resultados obtenidos revelaron la ocurrencia de infecciones latentes a nivel de tallo en las plantas inoculadas con *R. solanacearum* que permanecieron asintomáticas hasta el final del ensayo.

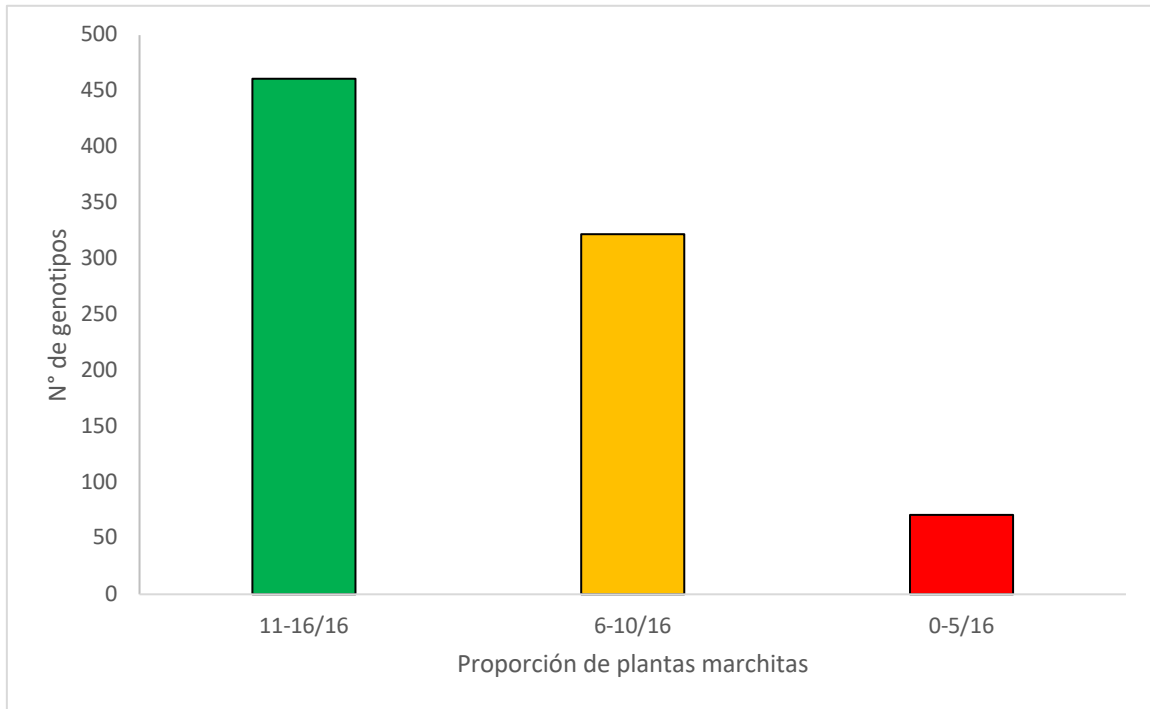


Figura 2.4. Histograma de la distribución de genotipos dependiendo de la proporción de plantas marchitas en la evaluación de resistencia a *Ralstonia solanacearum*. La columna verde representa a los genotipos con mayor índice de marchitamiento, la columna amarilla representa a los genotipos con un índice de marchitamiento intermedio y la columna roja representa a los genotipos con menor índice de marchitamiento.

Tabla 2.2. Genotipos del programa nacional de mejoramiento de papa (INIA) evaluados en función de su resistencia a la marchitez bacteriana.

Accesiones				
Código	Especie	Origen	Proporción de plantas marchitas	Observaciones
01.02.TA	<i>S. chacoense</i>	Colonia	3/16	Colecta de tubérculo o planta
02.04.1	<i>S. commersonii</i>	Rocha	11/16	Colecta de tubérculo o planta
04.02.3	<i>S. commersonii</i>	Colonia	10/16	Colecta de tubérculo o planta
04.09.T	<i>S. chacoense</i>	Río Negro	5/16	Colecta de tubérculo o planta
05.02.6	<i>S. commersonii</i>	Canelones	10/16	Colecta de tubérculo o planta
05.05.2	<i>S. commersonii</i>	Canelones	15/16	Colecta de tubérculo o planta
05.05.21.8	<i>S. commersonii</i>	Canelones	15/16	Colecta de tubérculo o planta
07.01.7	<i>S. chacoense</i>	Salto	5/16	Colecta de tubérculo o planta
10.01.18	<i>S. commersonii</i>	Paysandú	11/16	Colecta de tubérculo o planta
10.05.8	<i>S. chacoense</i>	Salto	6/16	Colecta de tubérculo o planta
10.07.3	<i>S. commersonii</i>	Artigas	13/16	Colecta de tubérculo o planta
10.08.5	<i>S. commersonii</i>	Artigas	12/16	Colecta de tubérculo o planta

Resultados

Cultivares comerciales y materiales de referencia				
Código	Pedigree progenitores	Origen	Proporción de plantas marchitas	Observaciones
391919.3	69.4 (1043) BW	CIP	9/16	
394895.7	BWH 87.230R x C 90	CIP	15/16	
394903.5	Cruza 148 x BW 87.183	CIP	3/16	
394904.20	Cruza 148 x C 90.205	CIP	11/16	
394905.8	Cruza 148 x C 90.205	CIP	9/16	
394906.6	BW 87.420 x C 90205	CIP	5/16	
395193.6	C 91.612 x C 90.230	CIP	13/16	
395447.24	BW 87.176 x XY 16	CIP	9/19	
396287.5	TXY.3 x I 1039	CIP	9/16	
Arequita	Amorosa x 97145.4	INIA	13/16	
Arinda	Vulkano x Ar	Holanda	13/16	
Baraka	SVP 50+308 x Avenir	Holanda	11/16	
Chieftain	La 1027-18 x La 1534	EEUU	14/16	
Cruza 148	Desconocido	CIP	16/16	
Granola	3333.60 x 267.04	Alemania	16/16	

Resultados

M. Lisa	Bierma A 1.287 x Colmo	Holanda	9/16
MB 120-08	MB 98.46 x MB 03	EMBRAPA	9/16
MB 195-10	MB 03 x 384515.1	EMBRAPA	10/16
MB 51-01	MB 9846.1 x Baraka	EMBRAPA	9/16
MB 51-02	MB 9846.1 x Baraka	EMBRAPA	16/16
MB 57-32	MB 9846.1 x Baraka	EMBRAPA	12/16
MB 9846-1	391783.6 x BP 88166.5	EMBRAPA	16/16
94212.1	<i>Solanum phureja</i>	-	9/16
Sharpo Mira	76 PO x D 1267	Cultivada	16/16

Cruzamientos - Poblaciones

Código	Pedigree progenitores/Especie	Generación	N° individuos	N° individuos con Pm ^a			Observaciones
				11-16/16	6-10/16	0-5/16	
6.36	Matilda + <i>S. commersonii</i> 2:5	F1 Fuión somática	1	0	0	0	
06201.20	04.02.3 x 94212.1	F1	1	1	0	0	
08201	05.02.6 x 94206.1	F1	2	1	0	1	
08301.1	06201.6 x 382284.16	BC1	1	0	0	1	
08302.4	06201.20 x 382284.16	BC1	1	0	1	0	
08202.2	05.02.6 x 94206.1	F1	1	1	0	0	

Resultados

08203.1	04.09.T x 94206.1	F1	1	1	0	0
09505	08302.2 x 8809.2	BC2	3	3	0	0
09506	08302.2 x Bulk BW*	BC2	3	1	1	1
09510	08302.4 x 8809.2	BC2	3	1	2	0
09509	08302.4 x Bulk BW	BC2	5	2	1	2
10201	10.10.10 x 8809.2	F1	39	15	14	10
10202	10.10.10 x 382284.16	F1	17	3	9	5
10203	04.09.T x 8809.2	F1	4	4	0	0
10204	04.02.3 x <i>S. phureja</i>	F1	23	16	7	0
10205	02.04.1 x <i>S. phureja</i>	F1	37	19	15	3
10301	06201.6 x 382284.16	BC1	1	1	0	0
10302	06202.4 x 382284.16	BC1	6	6	0	0
10303	06202.4 x 8809.2	BC1	21	10	7	4
10401	08301.1 x 394895.7	BC2	15	14	1	0
10402	08301.1 x 394903.5	BC2	35	24	11	0
10403	394895.7 x 08301.1	BC2	2	2	0	0
11009	09501.2 x 97145.4	BC3	1	1	0	0
11201	07.01.7 x 97145.4	F1	27	19	6	2

Resultados

11202	10.10.10 x 97145.4	F1	6	5	1	0
11203	10.10.24 x 97145.4	F1	32	19	10	3
11204	10.10.29 x 97145.4	F1	24	14	9	1
11205	10.10.30 x 97145.4	F1	4	2	0	2
11206	04.09.T x 97145.4	F1	33	28	5	0
11302	08201.4 x 97145.4	BC2	5	5	0	0
11305	08203.1 x 97145.4	BC2	18	17	1	0
11306	06201.20 x 97145.4	BC3	8	4	2	2
12101	02.04.1 x 94209.1	F1	23	19	4	0
12104	MS 1.22 x S. phureja	F1	1	1	0	0
12106	10.10.10 x 8809.2	F1	1	1	0	0
12108	07.01.7 x 8809.2	F1	3	3	0	0
12109	04.09.T x 8809.2	F1	1	1	0	0
12304	10205.1 x 8809.2	BC1	1	1	0	0
13001	05.02.4 x 02.04.1	Cmm x Cmm ^b	200	62	117	21
13101	05.02.6 x 04106.6	F1	2	1	1	0
13102	02.04.1 x 04106.6	F1	22	14	8	0
13103	01.02.TA x 95043.11	F1	5	0	5	0

Resultados

13104	04.09.T x 95043.11	F1	3	0	3	0	
13106	10.10.10 x 97145.4	F1	2	1	1	0	
13202	10421 x <i>S. phureja</i>	BC1	1	1	0	0	
13203	10202.1 x 95043.11	BC1	22	1	21	0	
13204	10205.1 x 95043.11	BC1	19	10	7	2	
13205	10201.39 x 95043.11	BC1	9	3	6	0	
13207	11205.2 x 95043.11	BC1	24	3	19	2	
13208	11201.29 x 95043.11	BC1	9	1	7	1	
13209	11202.3 x 95043.11	BC1	5	2	1	2	
Tb1	<i>S. commersonii</i>	-	13	13	0	0	Colecta de semilla vegetativa (bayas) - Tacuarembó
RS1	<i>S. commersonii</i>	-	17	17	0	0	Colecta de semilla vegetativa (bayas) - Rocha
MS1	<i>S. commersonii</i>	-	23	18	5	0	Colecta de semilla vegetativa (bayas) - Maldonado
SS3	<i>S. chacoense</i>	-	25	20	5	0	Colecta de semilla vegetativa (bayas) - Salto
09.02	<i>S. commersonii</i>	-	2	0	1	1	Colecta de semilla vegetativa (bayas)
10.10	<i>S. malmeanum</i>	-	4	1	3	0	Colecta de semilla vegetativa (bayas) - Artigas

^a Pm: Proporción de plantas marchitas. ^b Cmm: *S. commersonii*.

Con este procedimiento se obtuvo un resultado positivo de amplificación para todos los genotipos seleccionados, demostrando la presencia del patógeno viable a nivel de tallo.

En la Figura 2.5 se muestra a modo de ejemplo un gel de agarosa con los resultados de amplificación por multiplex-PCR de algunas de las muestras analizadas. Para todas las muestras mostradas en este ejemplo, la detección de *R. solanacearum* fue positiva en las muestras de tallo de plantas asintomáticas. La muestra 4 (genotipo 09.509.1) no presentó bandas de amplificación para ninguno de sus duplicados, pero al repetir la evaluación de este genotipo en un nuevo ensayo de inoculación esta respuesta no se mantuvo.

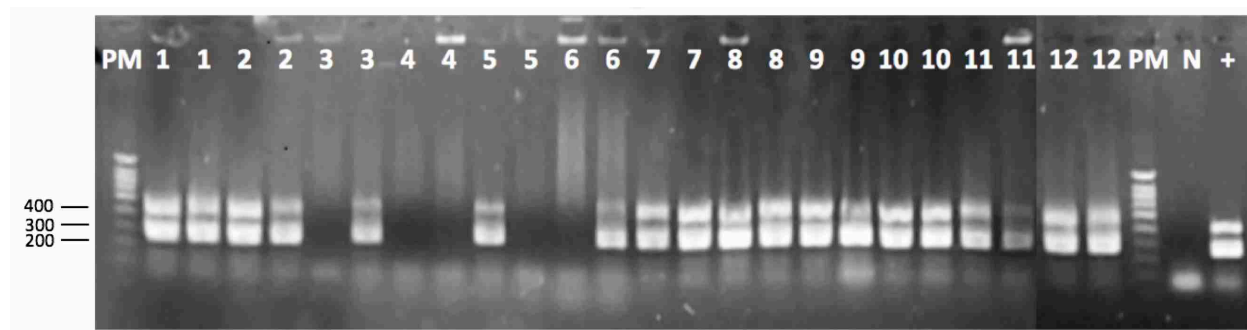


Figura 2.5. BIO-multiplex-PCR para la detección de infecciones latentes a nivel de tallo en plantas inoculadas con *Ralstonia solanacearum* que permanecieron asintomáticas luego de 28 días posteriores a la inoculación. La mutliplex PCR incluye *primers* específicos para cepas IIB-1 que amplifican un fragmento de 448 pb, en combinación con *primers* generales para todas las cepas de *R. solanacearum* que amplifican un fragmento de 280 pb. Fotografía de un gel de agarosa al 1,5%. Muestras: **1:** 06.201.20, **2:** 08.201.5, **3:** 09.506.3, **4:** 09.509.1, **5:** 09.509.6, **6:** 10.201.27, **7:** 10.201.32, **8:** 10.201.39-12, **9:** 10.202.1, **10:** 10.303.20, **11:** 11.201.27, **12:** 11.203.7. (+): control positivo de amplificación, N: control negativo (agua), PM: marcador de peso molecular (*Smart Ladder, Eurogenetec, 1-Kb*).

Las concentraciones del patógeno a nivel de tallo variaron entre 10^3 y 10^5 ufc/g, valores significativamente menores a los encontrados en plantas susceptibles con síntomas de marchitamiento que alcanzan los 10^9 ufc/g (Lowe-Power et al., 2018b).

A partir de las evaluaciones realizadas se seleccionaron 4 genotipos con diferentes niveles de resistencia a *R. solanacearum*: susceptibles y parcialmente resistentes (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Genotipos con diferentes niveles de resistencia a *Ralstonia solanacearum* seleccionados para estudios de interacción planta-patógeno.

Genotipo	Generación ^a	AUDPC ^b	Nivel de resistencia
<i>S. tuberosum</i> cv. Chieftain	<i>S. tuberosum</i>	62,6 A	Susceptible
13001.79	Cmm x Cmm	48,5 A	Susceptible
13001.107	Cmm x Cmm	17,1 B	Resistencia parcial
11.201.27	BC1	23,9 B	Resistencia parcial
09.509.6	BC2	15,8 B	Resistencia parcial

^aCmm: *Solanum commersonii*. ^bAUDPC: área bajo la curva de progreso de la enfermedad obtenida integrando los resultados de dos experimentos repetidos cada uno conteniendo 16 plantas de cada genotipo. Valores con la misma letra no son significativamente diferentes según el test de comparación múltiple de Tukey's, $P=0,05$.

La respuesta de estos genotipos a la infección por *R. solanacearum* se confirmó repitiendo la inoculación, evaluación de síntomas y detección de infección latente por BIO-PCR. Estos genotipos con respuesta diferencial a la marchitez bacteriana fueron utilizados en una etapa posterior de este trabajo para profundizar y caracterizar la respuesta observada. Los estudios realizados incluyen: i) análisis comparativo del proceso de colonización e infección mediante el uso de cepas reporteras de *R. solanacearum*, ii) evaluación de las respuestas de defensa de la planta frente a la infección del patógeno y iii) evaluación del efecto de minerales presentes en los tejidos de estos genotipos sobre los niveles de resistencia observados y la virulencia de la bacteria (Capítulos 3 y 4).

2.4.2 Construcción de cepas reporteras de *R. solanacearum*.

Se construyeron cepas reporteras de *R. solanacearum* con actividad fluorescente y luminiscente con el objetivo de desarrollar herramientas útiles para realizar el seguimiento del proceso de infección y colonización del patógeno a nivel de la planta. Las cepas reporteras fueron construidas a partir de la cepa de *R. solanacearum* UY031, de alta agresividad en papa (Siri et al., 2011). Esta cepa pertenece al filotipo IIB-1, reconocido como el principal tipo de cepas causantes de marchitez bacteriana en papa en Uruguay y en regiones templadas a nivel mundial (Siri et al., 2011; Stulberg et al., 2018).

La estrategia adoptada para la incorporación de los sistemas reporteros implicó su integración en un sitio permisivo del genoma de la cepa de *R. solanacearum* receptora (UY031). Esto se logró gracias a la utilización del sistema de plásmidos integrativos pRC, lo que asegura una mayor estabilidad y eficacia respecto a otros mecanismos utilizados generalmente como ser la incorporación de los sistemas reporteros a nivel de plásmidos que se mantienen como episomas (Monteiro et al., 2012b).

Además, para garantizar una alta expresión de los sistemas reporteros, los mismos se acoplaron al promotor *PpsbA* que dirige la expresión constitutiva del gen de cloroplasto *psbA* involucrado en la fotosíntesis y que ya ha sido utilizado en la construcción de cepas reporteras para estudios *in planta* (Wang et al., 2007). De esta forma, se obtuvieron los vectores pRCG-Pps-lux y pRCG-Pps-GFP que integran al operon *luxCDABE* (*lux*) y a la proteína verde fluorescente (GFPuv) respectivamente, ambos bajo el control del promotor constitutivo *PpsbA*. En este trabajo también se utilizaron los vectores pRCG-Pep-lux y pRCG-Pep-GFP, diseñados en un trabajo previo que acoplan los sistemas reporteros al promotor nativo *Peps* (Monteiro et al. 2012b). Este promotor dirige la expresión del operón involucrado en la síntesis del polisacárido extracelular (EPS) producido en grandes cantidades cuando *R. solanacearum* se encuentra a altas densidades dentro del xilema de la planta (Monteiro et al., 2012a).

En la Figura 2.6 se representan las etapas realizadas para la integración de estas construcciones en la cepa de *R. solanacearum* UY031. En una primera instancia, se realizó la adaptación genética de esta cepa integrando las regiones GMI1000-1 y GMI1000-2, que son las regiones de homología presentes en los vectores pRC. Para ello, se realizó una primera etapa de transformación natural de la cepa UY031 con el vector pCOMP-PhII, seguida de la selección de la cepa recombinante UY031-COMP por incorporación de resistencia a la tetraciclina. Posteriormente, se realizó una nueva etapa de transformación natural sobre la cepa UY031-COMP con los cuatro vectores pRC construidos (Tabla 2.1). En este caso, la selección de las colonias que integraron la construcción correspondiente se realizó por incorporación de resistencia a gentamicina y verificación de pérdida del marcador de resistencia a tetraciclina. De esta forma se obtuvieron las cepas UY031 Pps-lux, UY031 Pps-GFP, UY031 Pep-lux y UY031 Pep-GFP, que contienen estas construcciones integradas al cromosoma de la bacteria a continuación del gen RSUY_30700 (*glmS*). Las regiones integradas a su vez están flanqueadas por terminadores transcripcionales para evitar la transcripción de las regiones cromosomales vecinas.

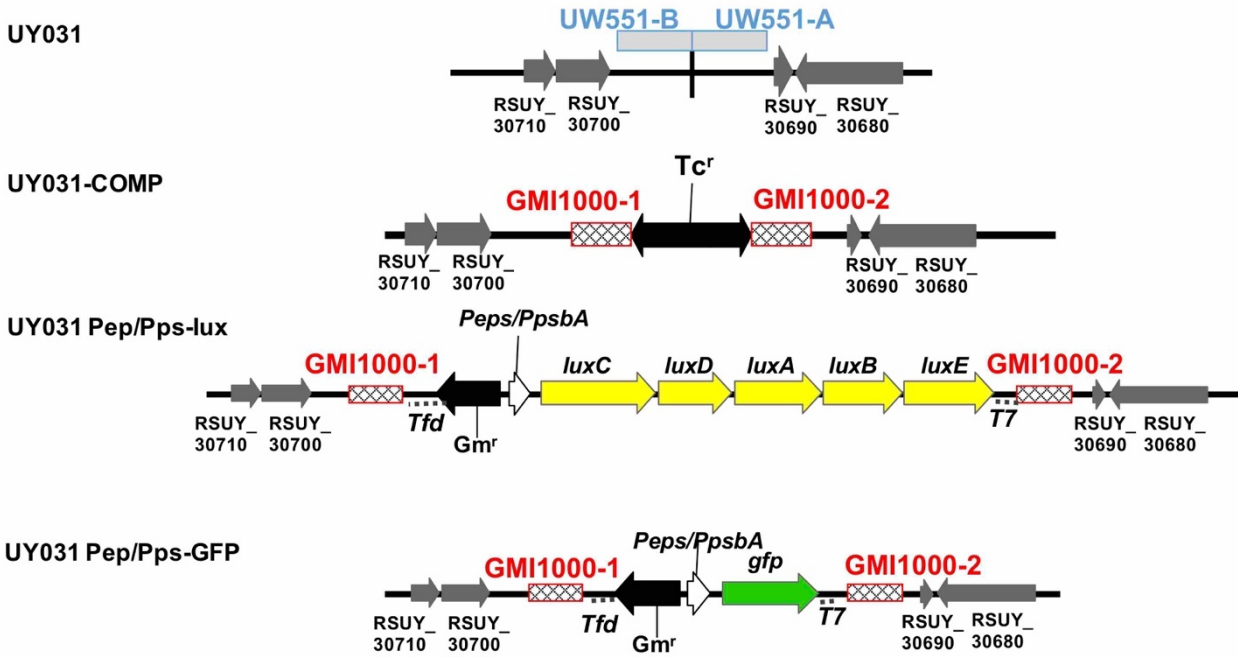


Figura 2.6. Representación esquemática de las etapas realizadas para el desarrollo de cepas reporteras de *Ralstonia solanacearum* mediante integración genómica de los sistemas reporteros lux y GFP en la cepa UY031.

2.4.3 Validación de las cepas reporteras desarrolladas.

2.4.3.1 Verificación de integraciones mediante PCR.

En primer lugar, se verificó mediante amplificación por PCR la correcta integración genómica de los sistemas reporteros en las cepas desarrolladas. La amplificación se realizó sobre varios clones generados a partir de las transformaciones con los diferentes sistemas reporteros, obteniendo en todos los casos un producto del tamaño esperado que a su vez fueron verificados por secuenciación. En la Figura 2.7 se muestra a modo de ejemplo la verificación de un clon de cada cepa construida UY031 Pep-GFP, UY031 Pep-lux, UY031 Pps-GFP UY031 Pps-lux.

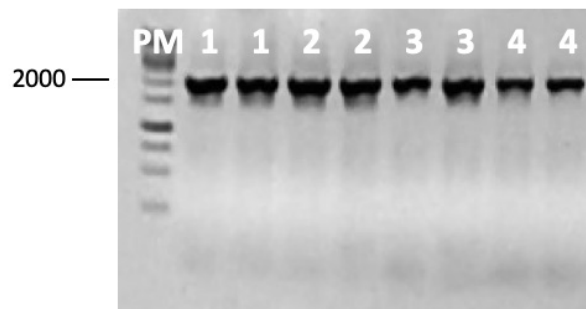


Figura 2.7. Amplificación por PCR utilizando *primers* dirigidos a la zona de integración en el genoma de *Ralstonia solanacearum* que amplifican un fragmento de 2000 pb. Fotografía de un gel de agarosa al 1%. **1:** UY031 Pep-lux, **2:** UY031 Pep-GFP, **3:** UY031 Pps-GFP, **4:** UY031 Pps-lux. PM: marcador de peso molecular (*Smart Ladder, Eurogenetec, 1-Kb*).

2.4.3.2 Evaluación de la virulencia de las cepas reporteras desarrolladas.

Se realizaron inoculaciones con las cepas reporteras y la cepa UY031 sin transformar para determinar si la integración tuvo algún efecto sobre el crecimiento y la virulencia del patógeno, dado que la integración de genes que no pertenecen al genoma de la cepa UY031 y la expresión de los sistemas reporteros podrían generar cambios en la virulencia del patógeno. En la Figura 2.9 se muestra la evolución de la marchitez bacteriana en plantas de *S. tuberosum* (Chieftain) y *S. commersonii* (F118) inoculadas con la cepa UY031 sin transformar y algunas de las cepas reporteras construidas que representan los sistemas reporteros integrados en el genoma de *R. solanacearum*. Todas las cepas produjeron los síntomas típicos de marchitamiento en ambos hospederos evaluados, aunque en general se observaron síntomas más severos en *S. tuberosum* en comparación con el genotipo de *S. commersonii*. No se encontraron diferencias significativas en la virulencia de las cepas reporteras respecto a la cepa UY031 sin transformar en ninguno de los hospederos evaluados ($P = 0.4604$ para *S. tuberosum* y $P = 0.2181$ para *S. commersonii*). Por otro lado, tampoco se observaron defectos de crecimiento en ninguna de las cepas reporteras desarrolladas (Figura 2.8). Estos resultados demuestran que la región dónde se realizó la integración en el cromosoma de la cepa UY031 es un lugar permisivo para la integración de construcciones genéticas, y que la expresión de los sistemas reporteros lux y GFP no afecta al crecimiento ni a la patogenicidad de las cepas reporteras de *R. solanacearum*.

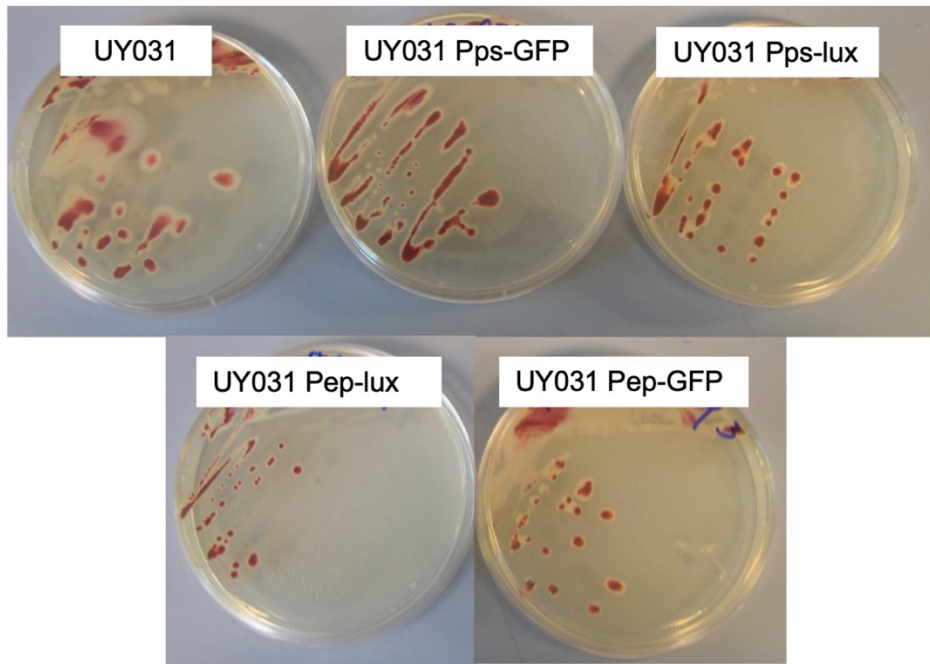


Figura 2.8. Imágenes del fenotipo de la colonia de las cepas construidas y la cepa sin transformar.

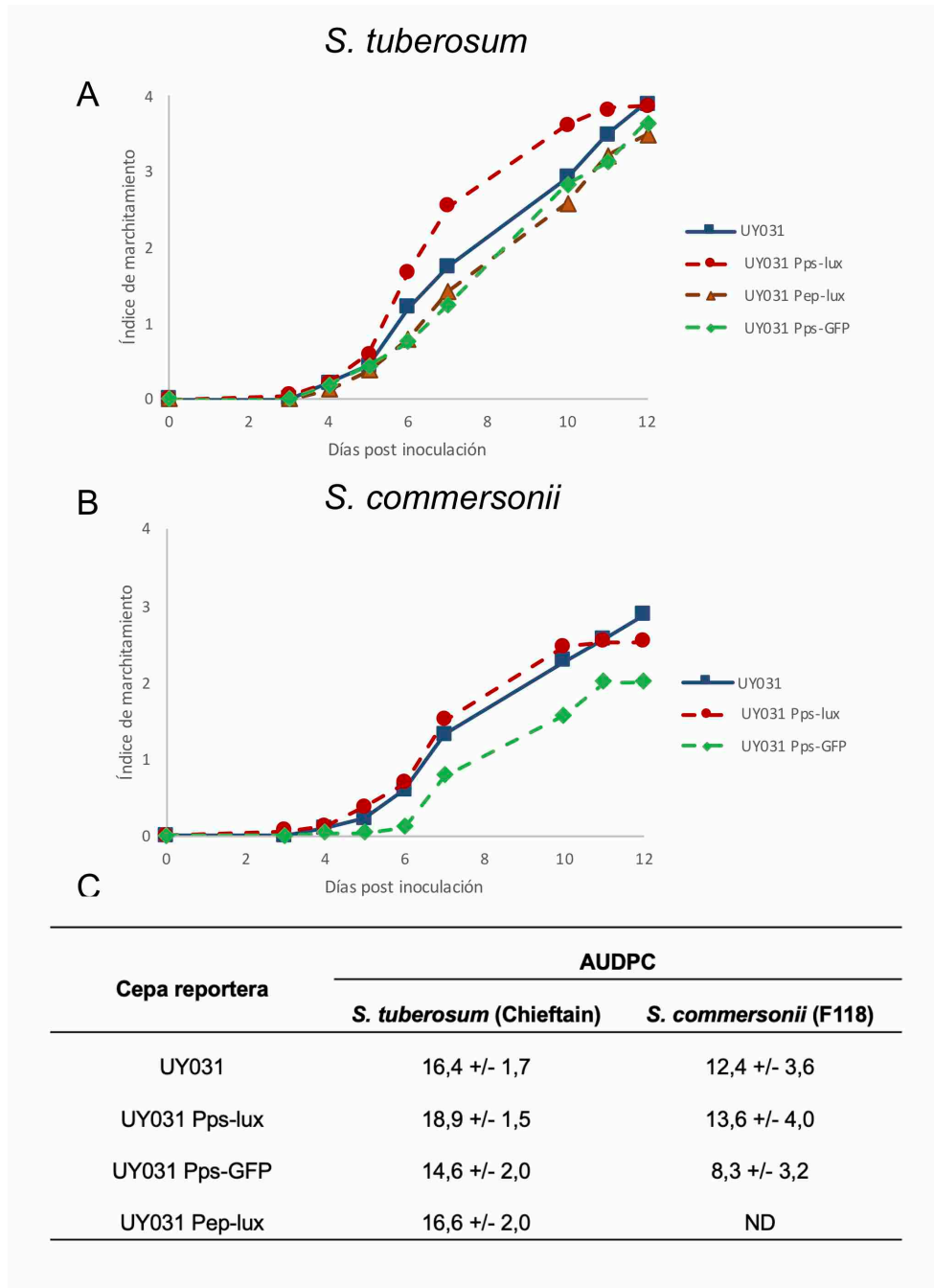


Figura 2.9. Virulencia de las cepas reporteras de *Ralstonia solanacearum* desarrolladas. Curvas del progreso de la marchitez bacteriana en *Solanum tuberosum* (Chieftain) **(A)** y en *Solanum commersonii* (F118) **(B)**, luego de la inoculación con la cepa UY031, UY031 Pps-lux, UY031 Pps-GFP y UY031 Pep-lux. Cada punto representa el promedio de dos experimentos con un total de 8 réplicas por cepa. **C**: Área bajo la curva de evolución de la enfermedad (AUDPC) +/- error estándar. No se encontraron diferencias significativas entre el AUDPC de las distintas cepas en ninguno de los hospederos evaluados ($P = 0,05$). ND: No determinado.

2.4.3.3 Evaluación de la emisión de fluorescencia y luminiscencia *in vitro*.

Con el fin de verificar la expresión de los sistemas reporteros y comparar la actividad de los promotores utilizados se realizaron evaluaciones del nivel de señal de fluorescencia o luminiscencia emitidas a diferentes densidades celulares (OD_{600}) (Figura 2.10). También se incluyó a la cepa UY031 silvestre como control para su comparación respecto a las cepas transformadas, verificando que no emite niveles detectables de fluorescencia ni luminiscencia a lo largo de su crecimiento. Estas evaluaciones se realizaron en medio mínimo ya que este medio simula las condiciones del apoplasto de la planta, siendo utilizado generalmente como una aproximación para determinar el comportamiento de la bacteria dentro del hospedero (Brennic and Winans, 2005).

En el caso de las cepas reporteras fluorescentes se realizaron determinaciones a intervalos regulares hasta llegar a la fase estacionaria de crecimiento. Se observó que la cepa UY031 Pps-GFP emitió una mayor intensidad de fluorescencia a iguales densidades celulares que la cepa UY031 Pep-GFP (Figura 2.10-A). En las primeras etapas de la curva de crecimiento, la cepa UY031 Pps-GFP creció más rápido que UY031 Pep-GFP y que la cepa sin transformar, pero luego en la fase estacionaria alcanzó una concentración en cultivo similar a las otras dos cepas.

En el caso de las cepas reporteras luminiscentes también se observó una correlación entre la OD_{600} y la luminiscencia emitida por los cultivos bacterianos (Figura 2.10-B). Al igual que en la comparación de los sistemas reporteros fluorescentes, la cepa UY031 Pps-lux emitió luminiscencia de manera más eficiente que la cepa UY031 Pep-lux.

Estos resultados confirman la conveniencia de acoplar los sistemas reporteros a un promotor constitutivo como lo es *PpsbA*. En base a los resultados obtenidos se seleccionaron las cepas UY031 Pps-GFP y UY031 Pps-lux para los posteriores ensayos *in planta*.

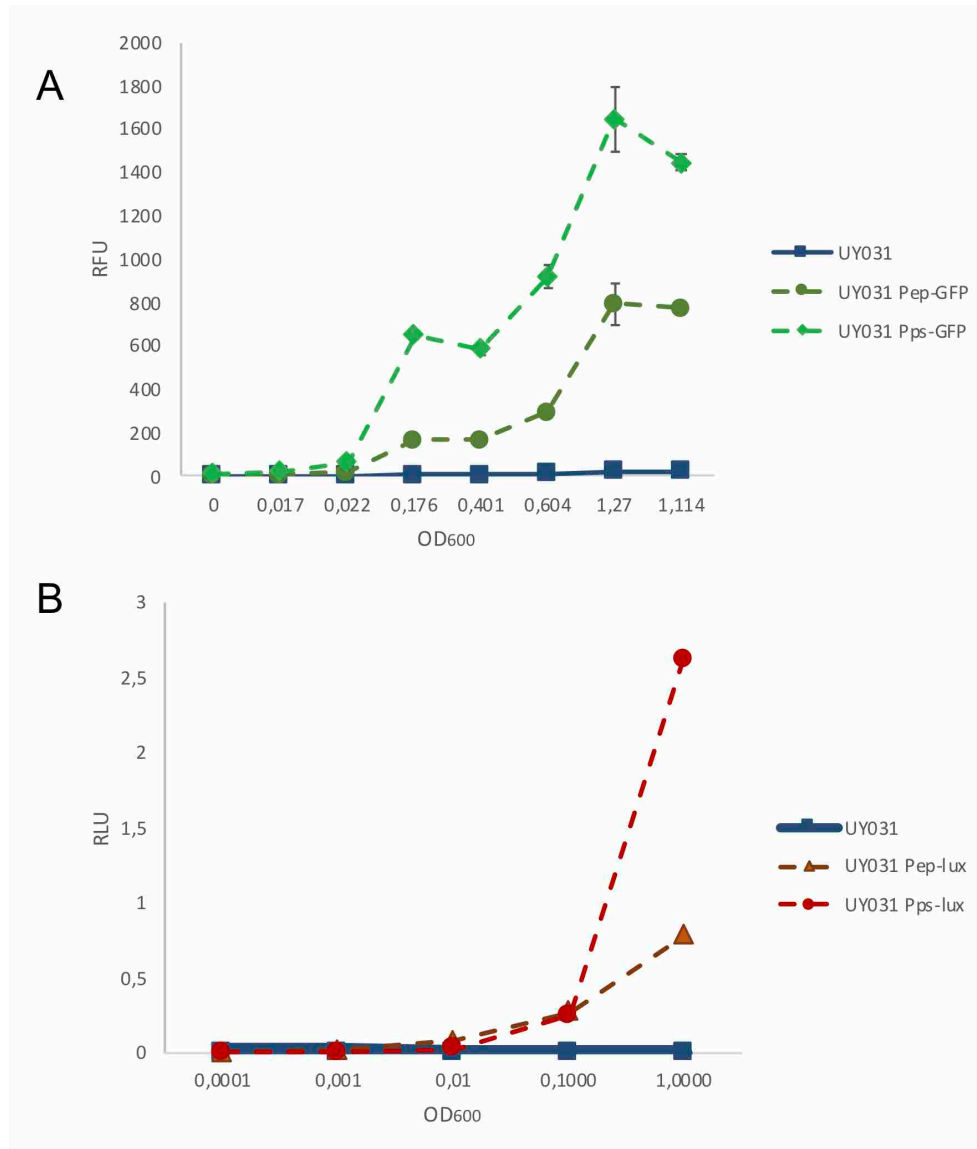


Figura 2.10. Evaluación de la emisión de fluorescencia y luminiscencia de las cepas reporteras de *Ralstonia solanacearum* en medio mínimo. **A:** Curvas de crecimiento en medio mínimo de las cepas reporteras UY031 Pep-GFP, UY031 Pps-GFP y de la cepa silvestre UY031. Las medidas de fluorescencia están expresadas en unidades relativas de fluorescencia (RFU). **B:** Detección de luminiscencia a distintas concentraciones bacterianas. Las medidas de luminiscencia están expresadas en unidades relativas de luminiscencia (RLU). Cada punto representa el promedio de 3 réplicas por cepa +/- error estándar.

Observando la Figura 2.10 se puede concluir que en estas condiciones de ensayo la sensibilidad de detección de las cepas reporteras es de $OD_{600}=0,01$ lo que corresponde a una concentración aproximada de 10^7 ufc/ml.

Con el objetivo de evaluar la posibilidad de disminuir la sensibilidad de detección del sistema reportero luminiscente, se cuantificó la luminiscencia emitida por la cepa seleccionada utilizando un luminómetro

de tubo en lugar de uno de placas como el utilizado anteriormente. Para ello, se prepararon suspensiones bacterianas de 10^5 - 10^8 ufc/ml de la cepa UY031 Pps-lux y la cepa silvestre, determinando la luminiscencia en estas nuevas condiciones (Tabla 2.4). Como resultado, se observó para la cepa reportera una correlación entre la OD₆₀₀ y la luminiscencia emitida por las suspensiones bacterianas, logrando una detección confiable a partir de 10^6 ufc/ml.

Tabla 2.4. Sensibilidad del sistema reportero Pps-lux determinado con luminómetro de tubo (Berhold, FB12).

OD ₆₀₀	UY031 (RLU)	UY031 Pps-lux (RLU)
0,0001	25+/- 0	50+/- 96
0,001	27+/- 0	3901+/- 971
0,01	25+/- 2	44504+/- 2251
0,1	22+/- 0	212090+/- 13680

2.4.3.4 Evaluación de las cepas reporteras fluorescentes *in planta*.

Después de construir las cepas reporteras, verificar que la integración del sistema reportero no afecta su virulencia y probar que estos sistemas eran activos durante el crecimiento *in vitro* de la bacteria, se probó la actividad durante el proceso de infección en la planta. Para ello, se realizaron inoculaciones en tallo con la cepa UY031 Pep-GFP en genotipos con diferentes niveles de resistencia a *R. solanacearum* (F97 y F118) (Figura 2.11).

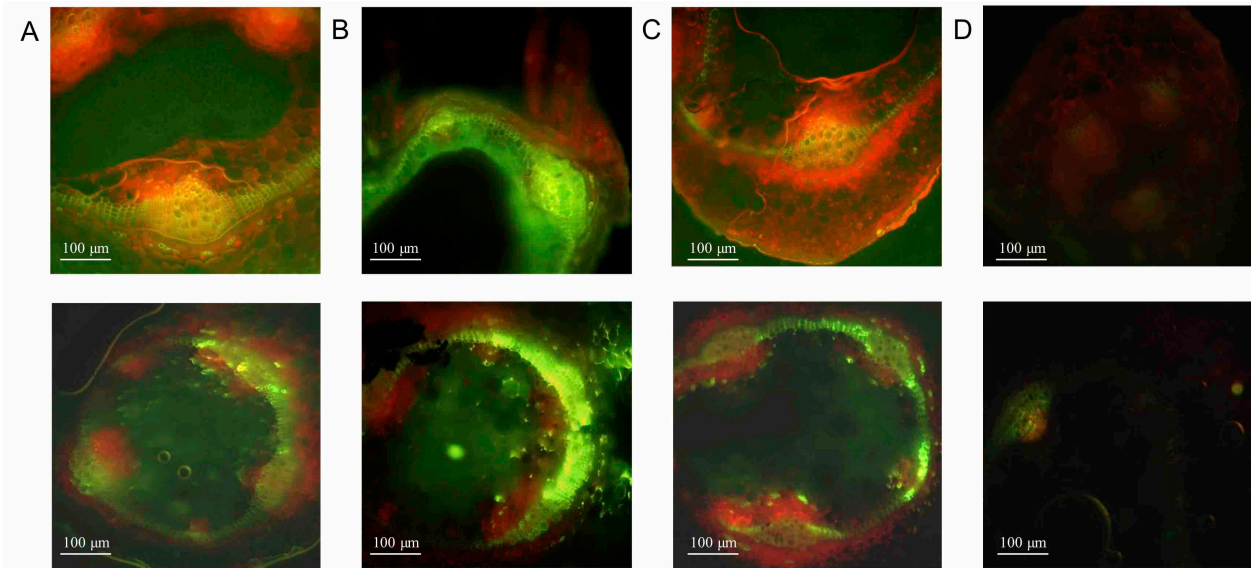


Figura 2.11. Evaluación de la emisión de fluorescencia de la cepa *Ralstonia solanacearum* UY031 Pep-GFP en plantas de *Solanum commersonii* (genotipo F97, panel superior y F118, panel inferior) inoculadas a nivel del pecíolo **A:** Corte transversal de tallo por debajo del punto de inoculación. **B:** Corte transversal de tallo en el punto de inoculación. **C:** Corte transversal de tallo por encima del punto de inoculación. **D:** Control negativo. Las imágenes fueron tomadas 5 dpi con microscopio de epifluorescencia con objetivo 10X y filtro DAPI UV-Visible. Las imágenes son representativas de 4 réplicas biológicas.

Como se puede observar en la Figura 2.11, hay una clara diferenciación entre el control negativo y los cortes de las plantas inoculadas con la cepa UY031 Pep-GFP. En ambos genotipos se observó la colonización del sistema vascular principalmente en el sitio de inoculación. En las zonas del tallo por encima y por debajo del sitio de inoculación se observó diseminación del patógeno a través del xilema de la planta pero en menor concentración. Las plantas donde se realizaron los cortes presentaban síntomas avanzados de marchitamiento.

En una segunda etapa, se optimizaron las condiciones para realizar observaciones mediante microscopía confocal de fluorescencia. Se ensayaron diferentes variantes para el soporte y montaje de los cortes vegetales, concluyendo que la inmersión del tejido en agarosa al 1% contenida en cámaras de vaselina sólida era el mejor sistema para realizar las observaciones (Figura 2.12-A). En todos los experimentos donde se realizó análisis mediante microscopía confocal a lo largo de este trabajo (Capítulos 2 y 3) se continuó utilizando este tipo de soporte para los cortes vegetales.

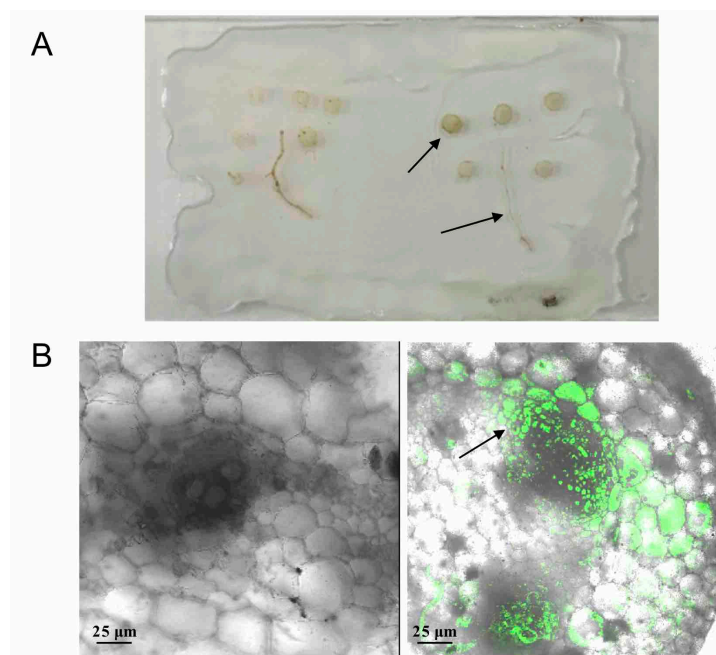


Figura 2.12. A: Cámaras para soporte y montaje de los cortes vegetales. Las flechas negras indican los cortes transversales de tallo y fragmentos de raíces. **B:** Evaluación de la emisión de fluorescencia de la cepa *Ralstonia solanacearum* UY031 Pps-GFP en plantas de *Solanum commersonii* (11201.27) inoculadas a nivel del pecíolo. Corte transversal de tallo en el punto de inoculación, la flecha negra indica las zonas colonizadas por la bacteria (derecha). Control negativo (izquierda). Imágenes tomadas 7 dpi con microscopio confocal con objetivo 20X. Imágenes representativas de 3 réplicas biológicas.

En la Figura 2.12-B se muestran imágenes tomadas con microscopio confocal del genotipo 11201.27 (parcialmente resistente) inoculado en tallo con la cepa UY031 Pps-GFP. Mediante esta metodología también hay una clara diferenciación entre el control negativo y el corte transversal de la planta inoculada con la cepa fluorescente. Se observa la colonización del sistema vascular en el sitio de inoculación y distribución por el apoplasto.

Posteriormente, se ensayó la inoculación de las plantas a nivel de suelo, utilizando el mismo método que para el *screening* de resistencia. Se utilizó la cepa UY031 Pps-GFP y se realizaron observaciones a nivel de tallo y raíces mediante microscopía confocal de fluorescencia. En plantas con síntomas visibles de marchitamiento, el patógeno se encontró en altas concentraciones, pudiendo observar células de *R. solanacearum* colonizando los haces vasculares y distribuidas por todo el apoplasto (Figura 2.13-A). En plantas asintomáticas, es posible distinguir células de *R. solanacearum* en algunos de los haces vasculares pero en muy baja concentración (Figura 2.13-B), tal como se espera que ocurra en una planta con infección latente.

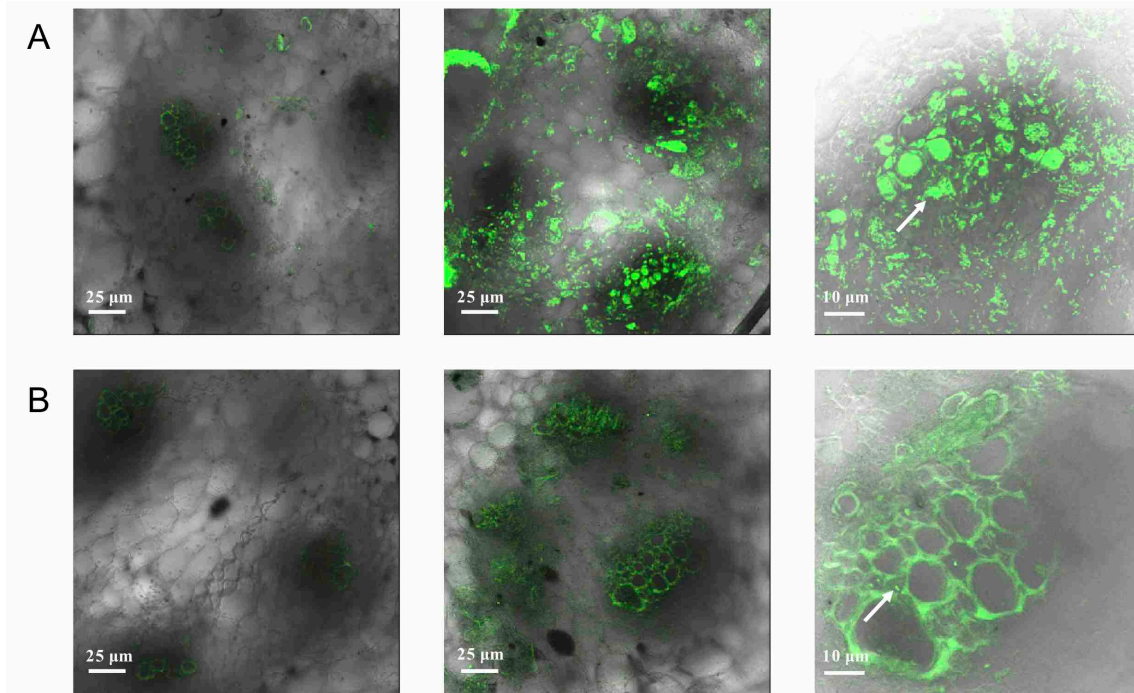


Figura 2.13. Evaluación de la emisión de fluorescencia de la cepa de *Ralstonia solanacearum* UY031 Pps-GFP en plantas inoculadas en suelo. **A:** Corte transversal de tallo de planta sintomática de *Solanum tuberosum* cv. Chieftain (susceptible). **B:** Corte transversal de tallo de planta asintomática de *Solanum commersonii* (11201.27, parcialmente resistente). Las imágenes fueron tomadas con microscopio confocal 13 dpi con diferentes aumentos, 20X y 63X, los controles negativos son las imágenes sobre la izquierda. Las flechas blancas indican donde se observan células de *R. solanacearum*. Las imágenes son representativas de 3 réplicas biológicas.

En las raíces tanto de las plantas con síntomas como asintomáticas de ambos genotipos evaluados se observó colonización con el patógeno (Figura 2.14).

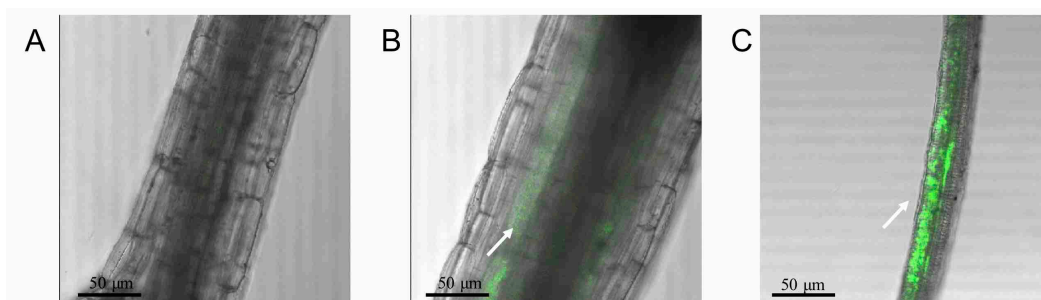


Figura 2.14. Evaluación de la emisión de fluorescencia de la cepa reportera de *Ralstonia solanacearum* UY031 Pps-GFP a nivel de raíces de plantas inoculadas en suelo. **A:** Control negativo. **B:** Planta sintomática de *Solanum tuberosum* cv. Chieftain (susceptible). **C:** Planta asintomática de *Solanum commersonii* (11201.27, parcialmente resistente). Las imágenes fueron tomadas con microscopio confocal 13 dpi con un aumento 20X. Las flechas blancas indican donde se observan células de *R. solanacearum*.

A través de esta metodología se obtuvieron muy buenos resultados cualitativos, ya que la microscopía confocal fusiona varias ventajas en comparación con la microscopía óptica de epifluorescencia. Dado que el microscopio confocal utiliza un láser que excita selectivamente en el rango donde se encuentra la longitud de onda de excitación del sistema reportero con GFPuv (395 nm), se evitan interferencias de autofluorescencia de los haces vasculares, como se observa por microscopía óptica de epifluorescencia (Figura 2.11). Por otro lado, es posible obtener una mejor calidad de las imágenes así como realizar observaciones con mayor aumento, lo que permite identificar con más exactitud las zonas de tejido infectadas.

Como en la evaluación *in vitro* la cepa UY031 Pps-GFP produjo mayores intensidades de fluorescencia en comparación con la cepa UY031 Pep-GFP se esperó que en planta también se observaría esa diferencia en la emisión de fluorescencia, pero en este caso los resultados obtenidos por microscopía para ambas cepas fueron similares.

Los resultados obtenidos a partir de estas evaluaciones verifican que el gen reportero bajo el control de cualquiera de los dos promotores evaluados (*Peps* y *PpsbA*) es expresado en el tejido vegetal, y que la integración de la construcción a nivel genómico es estable incluso en ausencia de presión de selección por el antibiótico.

2.4.3.5 Evaluación de las cepas reporteras luminiscentes *in planta*.

Por otro lado, se realizaron ensayos para validar el uso de cepas reporteras luminiscentes como herramienta para el seguimiento de la colonización del patógeno a nivel de la planta. En este caso, se evaluó únicamente la cepa UY031 Pps-lux por ser la que presentó mayores niveles de luminiscencia en cultivo.

Se inocularon en suelo plantas de *S. commersonii* (genotipos F97 y F118) y la luminiscencia emitida por la bacteria dentro de los tejidos aéreos de la planta fue detectada diariamente hasta los 7 dpi. El genotipo F97 mostró una alta proporción de plantas marchitas (7/8), en comparación con el genotipo F118 en donde se observó una mayor proporción de plantas asintomáticas al final del ensayo (2/8). En la Figura 2.15 se presenta la evolución de los síntomas de marchitamiento y de la luminiscencia detectada a lo largo de los días. Se puede observar una correlación entre el aumento y la extensión de luminiscencia y el avance de los síntomas de marchitamiento. Además, la detección de luminiscencia (zonas oscuras) se pudo observar

incluso antes de la aparición de los síntomas, demostrando la alta sensibilidad en la detección de la luminiscencia para evaluar el progreso de la enfermedad en comparación con el registro visual de los síntomas.

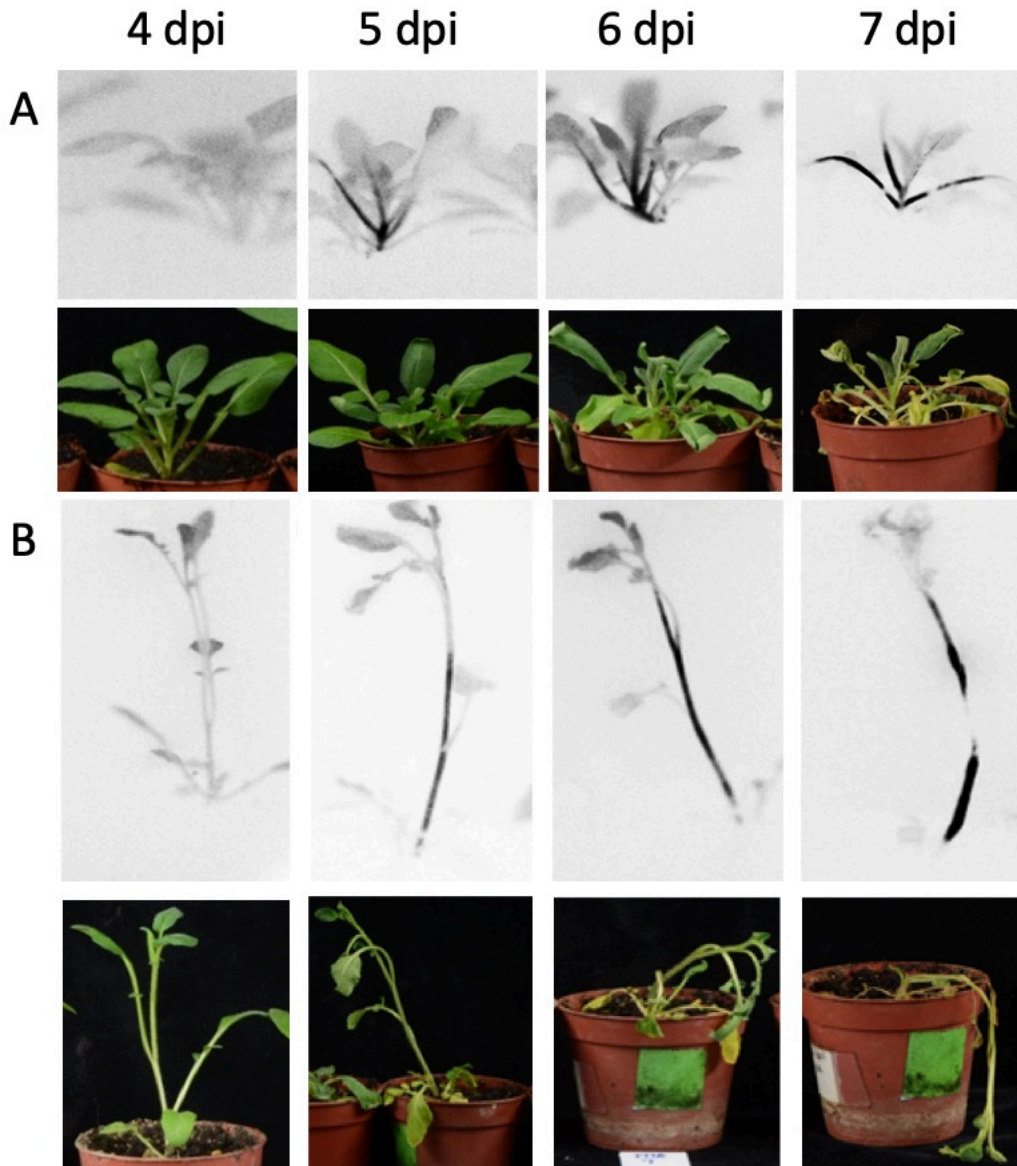


Figura 2.15. Evaluación de la emisión de luminiscencia en plantas de *Solanum commersonii* inoculadas en suelo con la cepa reportera de *Ralstonia solanacearum* UY031 Pps-lux. **A:** Genotipo F97. **B:** Genotipo F118. Los paneles superiores muestran la detección de luminiscencia emitida por la bacteria, las zonas grises indican autoluminiscencia debida a la clorofila y las zonas negras son las áreas de tejido colonizado por la cepa reportera luminiscente. Los paneles inferiores muestran la evolución de los síntomas a los 4, 5, 6 y 7 dpi.

En algunas ocasiones, se observaron plantas con diferente sintomatología, pero con cantidades de bacteria comparable, en base a la extensión de tejido colonizado por la cepa luminiscente (Figura 2.16).



Figura 2.16. Plantas de *Solanum commersonii* (genotipo F97) con colonización bacteriana similar mostrando diferente severidad en los síntomas (índice de marchitamiento 1 y 3 en la planta de la izquierda y derecha respectivamente). Plantas inoculadas en suelo con la cepa UY031 Pps-lux. Las imágenes superiores muestran los síntomas de marchitez bacteriana. Los paneles inferiores muestran la detección de luminiscencia emitida por la bacteria, las zonas grises indican autoluminiscencia debida a la clorofila y las zonas negras son las áreas de tejido colonizado por la cepa reportera luminiscente.

Por otro lado, se identificaron plantas con síntomas de marchitamiento en las cuales no se observó luminiscencia a nivel del tallo (Figura 2.17-A). En estos casos se hipotetizó que los síntomas pueden ser influenciados por la variabilidad en la localización de la infección. En la Figura 2.16, una infección de baja concentración de varios vasos vasculares podría causar un marchitamiento más severo que una colonización extensiva pero limitada únicamente a pocos vasos xilemáticos. En la Figura 2.17-A, la colonización de las raíces podría causar la obstrucción de los haces xilemáticos y el marchitamiento de la planta, antes de evidenciarse una extensa colonización del patógeno a nivel de los tejidos aéreos. Para verificar esta hipótesis, se extrajeron las raíces de estas y se analizaron en un luminómetro, verificando

la presencia de la bacteria luminiscente a nivel de las raíces (Figura 2.17-B). Adicionalmente, se realizaron determinaciones cuantitativas de luminiscencia sobre esas plantas, tanto a nivel de tallo como de raíces con el objetivo de comparar la colonización en ambos tejidos (Figura 2.17-C). Previamente se verificó una buena correlación entre la luminiscencia cuantificada en la planta y la concentración bacteriana determinada mediante recuento en placa.

Como resultado, se detectaron niveles más altos de luminiscencia en las raíces, indicando mayor concentración del patógeno en este tejido. Se verificó la mayor sensibilidad de este método ya que fue capaz de cuantificar luminiscencia en ambos tejidos, a pesar de que la concentración cuantificada en los tallos fue hasta 10 veces menor que la cuantificada en raíces (Figura 2.17-C).

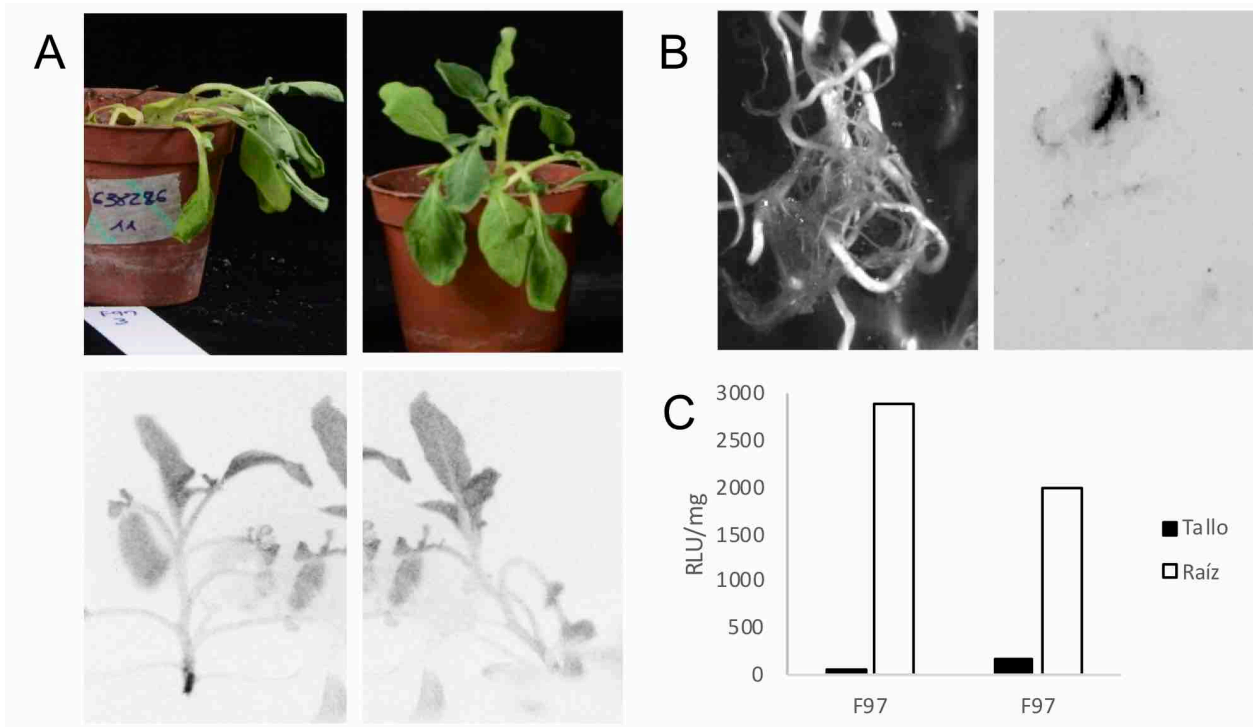


Figura 2.17. A: Plantas del genotipo F97 mostrando síntomas de marchitamiento sin colonización bacteriana en los tallos a los 7 dpi. Plantas inoculadas en suelo con la cepa UY031 Pps-lux. Las imágenes superiores muestran los síntomas de marchitez bacteriana. Los paneles inferiores muestran la detección de luminiscencia emitida por la bacteria, las zonas grises indican autoluminiscencia debida a la clorofila y las zonas negras son las áreas de tejido colonizado por la cepa reportera luminiscente. **B:** Raíz de planta con síntomas de marchitamiento sin detección de luminiscencia en tallo (izquierda) y detección de luminiscencia (derecha). **C:** Cuantificación de luminiscencia de plantas mostradas en la Figura 2.17-A. La luminiscencia fue detectada sobre las raíces y fragmentos de tallo. La emisión de luminiscencia de la cepa reportera se expresó en unidades relativas de luminiscencia (RLU) por miligramo de tejido.

Por otro lado, se evaluó también la aplicabilidad de este método para evaluar infecciones latentes en germoplasma con resistencia al marchitamiento causado por *R. solanacearum*. Para eso, se evaluó la luminiscencia a nivel de tallo y raíces en plantas del genotipo F118 que permanecieron asintomáticas luego de 7 dpi (Figura 2.18). En estos casos, no se evidenció luminiscencia a nivel de los tejidos aéreos en ninguna de las plantas evaluadas, mostrando una correlación con lo observado a nivel de síntomas. Las determinaciones cuantitativas de luminiscencia en tallo confirmaron estos resultados, ya que se detectaron niveles de luminiscencia muy bajos, menores a la luminiscencia basal detectada cuando las plantas se inocularon con la cepa UY031 sin transformar (10 RLU/mg).

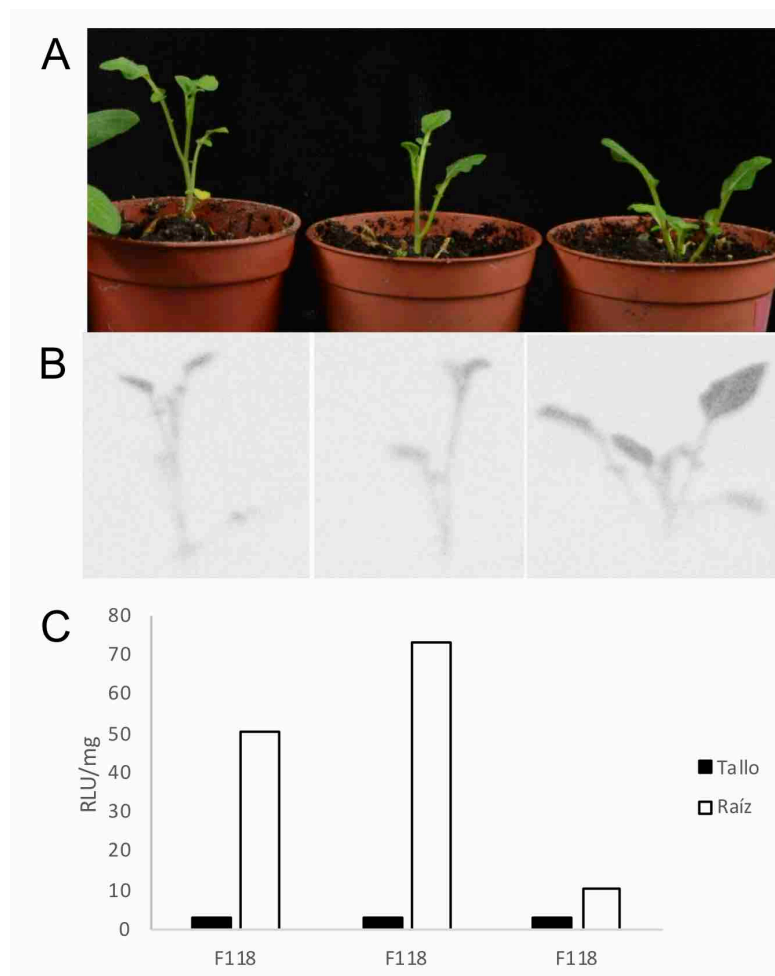


Figura 2.18. Evaluación de infecciones latentes en plantas de *Solanum commersonii* (genotipo F118) que permanecieron asintomáticas luego de 7 días posteriores a la inoculación con la cepa reportera luminiscente UY031 Pps-lux. **A:** Plantas del genotipo F118 sin síntomas de marchitamiento luego de 7 dpi. **B:** Evaluación de colonización a nivel de tallo mediante análisis en luminómetro LAS4000 (Fuji Film). **C:** Cuantificación de luminiscencia en fragmentos de tallo y raíces con luminómetro de tubo (Berthold, FB12). La emisión de luminiscencia de la cepa reportera se expresó en unidades relativas de luminiscencia (RLU) por miligramo de tejido.

A nivel de raíces, por el contrario, se lograron cuantificar niveles detectables de luminiscencia en la mayoría de las plantas asintomáticas evaluadas, evidenciando la efectiva colonización de estos tejidos. Como era de esperar, en estas plantas con infección latente se observan niveles de luminiscencia muy inferiores respecto a plantas susceptibles con síntomas de marchitamiento (Figura 2.17).

2.5 - DISCUSIÓN

2.5 Discusión.

Los programas de mejoramiento focalizados en el desarrollo de variedades de papa resistente a la marchitez bacteriana tienen dificultades por la falta de fuentes de resistencia estable contra *R. solanacearum* (Lopes et al., 2018). En este trabajo se evaluaron genotipos seleccionados generados en el programa de mejoramiento genético de papa desarrollado en INIA, que se basa en la utilización de la especie *S. commersonii* como fuente de resistencia. Esta especie silvestre fue anteriormente evaluada y se reportó su capacidad de resistencia contra *R. solanacearum* (Laferriere et al., 1999; Carputo et al., 2009). Sin embargo, estos estudios evaluaron uno o unos pocos genotipos y la fuente de resistencia no fue mejorada considerando las características agronómicas y comerciales requeridas. En contraste, nuestro programa nacional de mejoramiento genético de papa hizo uso de la gran variabilidad genética en esta especie, la cual está ampliamente distribuida y adaptada a nuestras condiciones ambientales (Pianzola et al., 2005; Siri et al., 2009, 2011; Gaiero et al., 2017). Los materiales avanzados provenientes del programa de mejoramiento generados a partir de diferentes retrocruzas mostraron en general resultados consistentes en las repeticiones de los experimentos donde se evaluó la resistencia a la marchitez bacteriana, demostrando la reproducibilidad del procedimiento de inoculación con daño de raíces y los resultados contrastantes en la respuesta contra la infección de *R. solanacearum*. Se observó que algunos genotipos luego de una o dos retrocruzas con *S. tuberosum* presentan una baja incidencia de marchitez bacteriana manteniendo la resistencia proveniente de la especie silvestre.

Las infecciones latentes asintomáticas causadas por *R. solanacearum* deben ser consideradas en los programas de mejoramiento para evitar la selección de variedades parcialmente resistentes las cuales podrían promover la diseminación del patógeno en condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad (Priou et al., 2005). Este problema no es exclusivo en papa, también han sido detectadas infecciones latentes en maní, tomate, morrón, berenjena y geranio (Grimault and Prior 1993; Swanson et al., 2005; Lebeau et al., 2011; Du et al., 2017). Evaluando los genotipos basados según los síntomas de marchitamiento y la detección del patógeno en el tejido de la planta, es posible diferenciar dos mecanismos de defensa: i) resistencia de la planta basada en limitar el acceso del patógeno al sistema vascular (resistencia completa o inmunidad) y ii) resistencia basada en la capacidad de sobrevivencia de la planta conteniendo a la bacteria dentro los haces vasculares xilemáticos y limitando su multiplicación (resistencia parcial, infecciones latentes) (Lebeau et al., 2011). En la evaluación de resistencia del

germoplasma derivado de la especie silvestre *S. comersonii*, ninguno de los genotipos evaluados a lo largo de estos años mostró tener inmunidad a la infección por *R. solanacearum*. Resultados similares han sido observados en variedades de papa del CIP y berenjena, donde no se han encontrado genotipos inmunes a la infección por *R. solanacearum* (Gutarra et al., 2015; Aslam et al., 2019).

Sin embargo, es importante considerar que la metodología utilizada en este trabajo para evaluar la resistencia es más severa que las condiciones usualmente encontradas en el campo. Las plantas utilizadas en los ensayos son pequeñas y poseen tallos finos y un sistema de raíces limitado, la inoculación se realiza con una concentración alta en suelo (10^6 ufc/g), las raíces son dañadas artificialmente y las condiciones de incubación de las plantas inoculadas son óptimas para el desarrollo de la enfermedad. En estudios recientes se ha comparado el método de inoculación con y sin daño previo de las raíces, inoculando plantas de *Arabidopsis thaliana* y tomate con *R. solanacearum*. Como resultado se encontró que el progreso de la enfermedad fue más severo cuando se realizó el daño en las raíces previamente (Aoun et al., 2017, Subedi et al., 2019). Cuando realizamos el daño previo a la inoculación en las raíces la enfermedad puede ser más severa, pero por otro lado al no realizarlo puede ocurrir que la inoculación no sea efectiva y se observe una mayor frecuencia de escapes. La aplicación de esta metodología es controversial y eso se ve reflejado en numerosos trabajos donde se evaluaron variedades con diferentes niveles de resistencia a *R. solanacearum* de tabaco, tomate, berenjena, papa y jengibre. La concentración del inóculo es otra variable comúnmente encontrada utilizando suspensiones bacterianas de 10^5 - 10^8 ufc/ml (Gutarra et al., 2015; Bittner et al., 2016, Salgón et al., 2017; Jiang et al., 2018; Aslam et al., 2019).

Las infecciones latentes en los cultivares de papa susceptibles pueden constituir una vía de diseminación del patógeno, particularmente en regiones templadas donde el desarrollo de la enfermedad es más lento. Introduciendo la detección de infección latente como nuevo criterio de selección en nuestro programa de mejoramiento se apuntó a evitar la selección de genotipos únicamente basados en los síntomas de marchitamiento. Aunque no se han encontrado genotipos completamente resistentes en este trabajo, clones con resistencia parcial altamente tolerantes que han mostrado una baja proporción de plantas marchitas fueron seleccionados como fuentes de resistencia y utilizados como progenitores en los cruzamientos realizados anualmente en el programa de mejoramiento de INIA. Es de destacar que estos materiales parcialmente resistentes presentan menores niveles de colonización que los materiales

susceptibles, destacando su valor como fuentes de resistencia, especialmente considerando las condiciones altamente exigentes que estamos utilizando en nuestro método de selección. Además del nivel de resistencia, para la selección de materiales parentales también se tuvieron en cuenta otras características como la fertilidad del polen, la calidad de los tubérculos producidos y otras características agronómicas.

Como producto de los *screenings* realizados a lo largo de estos años, se seleccionaron genotipos para usar como progenitores generando progenies que fueron evaluadas en ensayos a campo en EMBRAPA Hortalizas (Brasilia) en una etapa posterior a esta tesis (Figura 2.19). En esta región la enfermedad es endémica y el patógeno se encuentra presente en el suelo, lo que permite realizar evaluaciones a nivel de campo y bajo condiciones de infección natural (Lopes et al., 2018). Estas evaluaciones permitieron seleccionar materiales correspondientes a retrocruzas BC3 y BC4, que presentaron una muy baja proporción de plantas marchitas (<20%) en dos ensayos de evaluación a campo (Figura 2.19-A) (Carlos López, EMBRAPA Hortalizas, Brasilia, comunicación personal). En la Figura 2.19-B se puede observar que las características morfológicas de los tubérculos obtenidos de los materiales seleccionados se asemejan a los tubérculos de los cultivares comerciales.

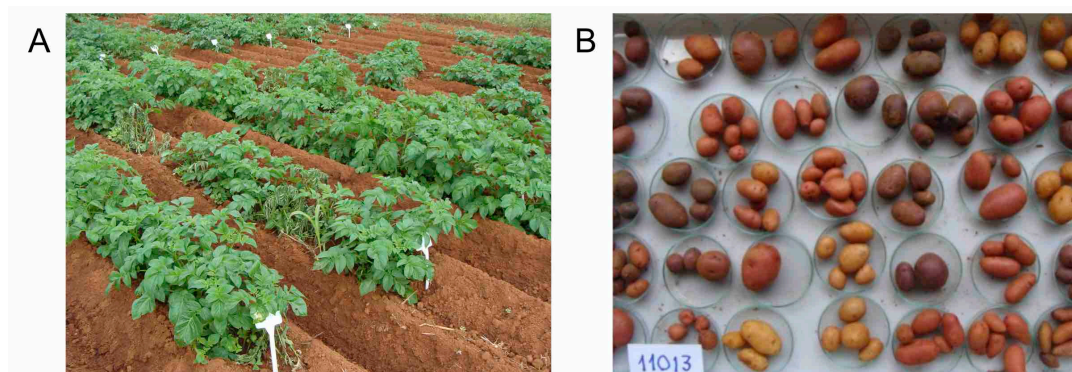


Figura 2.19. A: Ensayo de evaluación de resistencia a marchitez bacteriana de clones seleccionados del programa de mejoramiento genético de papa de INIA, realizado en condiciones de infestación natural en campo experimental de EMBRAPA Hortalizas Brasilia en una etapa posterior a esta tesis. **B:** Tubérculos obtenidos a partir de los materiales evaluados (imágenes cedidas por Carlos Lopes, EMBRAPA Hortalizas, Brasilia)

Estos materiales actualmente serán transferidos nuevamente al programa nacional de mejoramiento de papa de INIA para la evaluación de características agronómicas, apuntando a su liberación como nuevos cultivares en el corto plazo. El uso de variedades parcialmente resistentes en combinación con la rotación

de cultivos, semillas libres de patógeno y prácticas de saneamiento podría reducir significativamente las pérdidas debido a la marchitez bacteriana.

Por otro lado, en este trabajo se construyeron cepas reporteras de *R. solanacearum* con actividad fluorescente y luminiscente. La estrategia adoptada para la incorporación de los sistemas reporteros GFP y lux implicó su integración en un sitio permisivo del genoma de la cepa de *R. solanacearum* receptora (UY031), lo que aseguró una mayor estabilidad y eficacia respecto a otros mecanismos utilizados previamente (Monteiro et al., 2012b). En este trabajo se acoplaron los sistemas reporteros a dos promotores diferentes: el promotor nativo *Peps* que dirige la expresión del operón involucrado en la síntesis del polisacárido extracelular producido en grandes cantidades cuando *R. solanacearum* se multiplica dentro del xilema de la planta (Monteiro et al., 2012a); y el promotor *PpsbA* que dirige la expresión constitutiva del gen *psbA* involucrado en la fotosíntesis y que ya ha sido utilizado en la construcción de cepas reporteras para estudios *in planta* (Wang et al., 2007). Mediante esta estrategia se desarrollaron las cepas reporteras UY031 Pep-GFP, UY031 Pep-lux, UY031 Pps-GFP y UY031 Pps-lux (Tabla 2.1), las cuales desarrollaron la enfermedad en plantas de papa y de *S. commersonii* al igual que la cepa silvestre. A su vez, en el proceso de validación de las cepas construidas se verificó la correcta integración de los sistemas reporteros mediante PCR.

En una etapa posterior se evaluó la emisión de fluorescencia y luminiscencia *in vitro* y además se comparó la eficiencia de los dos promotores utilizados. Como resultado, tanto las cepas fluorescentes como las luminiscentes con el promotor *PpsbA* emitieron el sistema reportero con mayor intensidad lo que llevó a la selección de las cepas UY031 Pps-GFP y UY031 Pps-lux para los estudios realizados posteriormente para el seguimiento de la colonización en genotipos con diferentes niveles de resistencia (Capítulo 3). Mediante ensayos *in vitro* se verificó que la expresión de los sistemas reporteros no tuvo un efecto significativo sobre el crecimiento de la bacteria en medio líquido. En ambas cepas se observó una correlación entre la concentración bacteriana y la emisión de fluorescencia o luminiscencia, con un límite de detección entre 10^6 - 10^7 ufc/ml cuando las cepas fueron evaluadas *in vitro*. Estos resultados son similares con los observados en otras bacterias patógenas como *Pseudomonas syringae* y *Agrobacterium tumefaciens* que fueron transformadas con el sistema reportero GFPuv (Wang et al., 2007) y otras cepas de *R. solanacearum* que fueron transformadas con otros sistemas reporteros con GFP y el operon *luxCDABE* (Fujie et al., 2010; Du et al., 2017).

Cuando se realizó la detección *in vivo* de las cepas reporteras con actividad fluorescente se verificó que la bacteria puede ser monitoreada mediante microscopía de epifluorescencia y confocal. Se observaron zonas con la presencia de la bacteria tanto en los cortes transversales de tallo como en las raíces. Cuando se observaron los cortes de tejido con menores aumentos (objetivos 10X y 20X) se visualizaron regiones con coloración verde intensa que se corresponden con una colonización bacteriana en alta concentración (Figura 2.11 y Figura 2.13), mientras que con el objetivo de 63X en microscopio confocal se lograron visualizar claramente células independientes del patógeno en plantas con infección latente (Figura 2.13). La colonización bacteriana fue observada principalmente en las zonas donde se encuentran los haces del xilema, lugar donde normalmente se localiza y multiplica la bacteria luego de infectar la planta. Por otro lado, cuando las plantas se inocularon en tallo y luego fueron realizados cortes transversales hacia arriba y abajo del punto de inoculación 5 dpi (Figura 2.11), se observó que la mayor concentración bacteriana se encontraba en el punto de inoculación y en la zona superior se observó mayor colonización que en la zona inferior al punto de inoculación. Esta diferencia observada entre la zona superior e inferior refleja el movimiento del agua desde la raíz hacia las hojas a través de los haces xilemáticos. Como no era esperado, no se observó una diseminación avanzada de la bacteria en ese período de tiempo, estos resultados son comparables con los observados en tomate en un experimento similar donde se inoculó la planta con una cepa de *R. solanacearum* también con actividad fluorescente (Fujie et al., 2010). Estos resultados pueden indicar que la bacteria no es capaz de migrar de un haz vascular a otro diferente en un corto período de tiempo. El hecho de que los haces xilemáticos sean discontinuos podría ser una de las razones por lo cual en plantas con síntomas severos de marchitamiento no se observan bacterias a lo largo del tallo como fue observado en algunas plantas inoculadas con la cepa UY031 Pps-Lux (Figura 2.17-A) (Fujie et al., 2010). Luego de este proceso de evaluación de la cepa reportera fluorescente *in planta* se optó por continuar utilizando únicamente el microscopio confocal como metodología para el seguimiento de la bacteria *in vivo*, dado que se evitan interferencias de autofluorescencia y permite tomar imágenes con mayor aumento y nitidez. Entre las ventajas de la observación de cortes por microscopía confocal se encuentra principalmente la detección y monitoreo espacio-temporal del patógeno *in planta*. Por otro lado, esta técnica presenta limitaciones tales como la baja sensibilidad, la localización del patógeno limitada a una pequeña porción del tejido y la cantidad de tiempo implicado en la preparación de las muestras, así como en la observación de las mismas.

Se han reportado algunos trabajos que refieren al uso de cepas marcadas con GFP como herramienta para el estudio de la patogénesis de *R. solanacearum* (Aldon et al., 2000; Fujie et al., 2010; Kawasaki et al., 2007; Li et al., 2017; Yao y Allen, 2006). Se han ensayado diferentes estrategias para la introducción del marcador fluorescente en *R. solanacearum*, incluyendo la transformación con varios tipos de plásmidos y la integración genómica al azar por mini transposones. En 2007, Kawasaki et al. desarrollaron un vector GFP a partir de la modificación de un fago filamentoso que infecta específicamente a *R. solanacearum*, el cuál se mantiene en forma estable por más de 100 generaciones sin selección por antibióticos (Kawasaki et al., 2007). Este vector se utilizó para la generación de un sistema reportero aplicable al monitoreo espacio-temporal del patógeno en el tejido de la planta, contribuyendo al estudio del proceso de infección (Fujie et al., 2010). Actualmente no existe ningún reporte sobre el uso del sistema reportero GFP para el monitoreo del proceso de infección de *R. solanacearum* en papa. Por lo tanto, la aplicación de esta tecnología para el monitoreo del patógeno sobre el material resultante de programas de mejoramiento de papa, aporta una alternativa rápida e innovadora para el *screening* de resistencia a *R. solanacearum*.

Con respecto a la cepa reportera luminiscente UY031 Pps-lux, en todas las plantas infectadas se observó una correlación entre el aumento de la luminiscencia a lo largo del tiempo y el desarrollo de los síntomas (Figura 2.15). Sin embargo, fueron encontradas concentraciones bacterianas comparables que se correspondían con un distintos grados de sintomatología en diferentes plantas (Figura 2.16). Esta variación en los síntomas puede ser atribuida a la influencia del estado fisiológico de la planta en el desarrollo del marchitamiento y también podría reflejar variables en la localización de la infección. Por ejemplo, una infección de varios haces vasculares podría causar más síntomas de marchitamiento que una infección extensiva pero solo limitada a unos pocos haces xilémicos. Por lo cual, la evaluación de la luminiscencia es más robusta para determinar la colonización de la planta si lo comparamos con la observación fenotípica de los síntomas de marchitamiento ya que está menos influenciada por las condiciones ambientales.

Como fue mencionado anteriormente, las infecciones latentes son un grave problema en los programas de mejoramiento que usan únicamente la evaluación de síntomas como criterio de selección para resistencia a la marchitez bacteriana. La cepa reportera luminiscente de *R. solanacearum* desarrollada en este trabajo puede ser fácilmente identificada tanto en el tallo como en la raíz de los genotipos de papa

antes de la aparición de síntomas (Figura 2.15 y Figura 2.18). En las plantas asintomáticas, la infección no fue detectada en las zonas aéreas. Los síntomas de marchitamiento se correlacionaron con la presencia de la bacteria en las zonas aéreas de la planta detectada mediante luminiscencia. Cuando se cuantificó la luminiscencia en las raíces de las plantas asintomáticas del genotipo F118, algunas plantas mostraron emisión de luminiscencia detectable indicando infección latente, mientras en otras plantas no se detectó luminiscencia en las raíces (Figura 2.18). Esta metodología permite detectar la bacteria donde no se desarrollan los síntomas de la enfermedad, a unas concentraciones en las que otros métodos no disruptivos utilizados para evaluar germoplasma no podrían detectar la presencia de la bacteria.

El objetivo del desarrollo de las cepas reporteras fue implementar nuevas herramientas fáciles de utilizar para evaluar la resistencia a la marchitez bacteriana, mejorando el criterio de selección de genotipos potencialmente resistentes en los programas de mejoramiento, dado que genotipos parcialmente resistentes pueden llegar a tener alta concentración del patógeno sin mostrar síntomas de marchitamiento. La cepa luminiscente desarrollada en este trabajo puede ser utilizada para visualizar de una mejor manera la bacteria en la planta, cuando la luminiscencia es detectada en el luminómetro LAS4000 (FujiFilm) no implica la destrucción del tejido de la planta, esto es una ventaja dado que la misma planta puede ser evaluada a lo largo del tiempo. La aplicación de esta metodología combinada con el registro de los síntomas podría mejorar la selección y evaluación de genotipos resistentes. En la Figura 2.20 se resume como podría ser utilizada la cepa reportera luminiscente para facilitar el proceso de selección en el programa de mejoramiento.

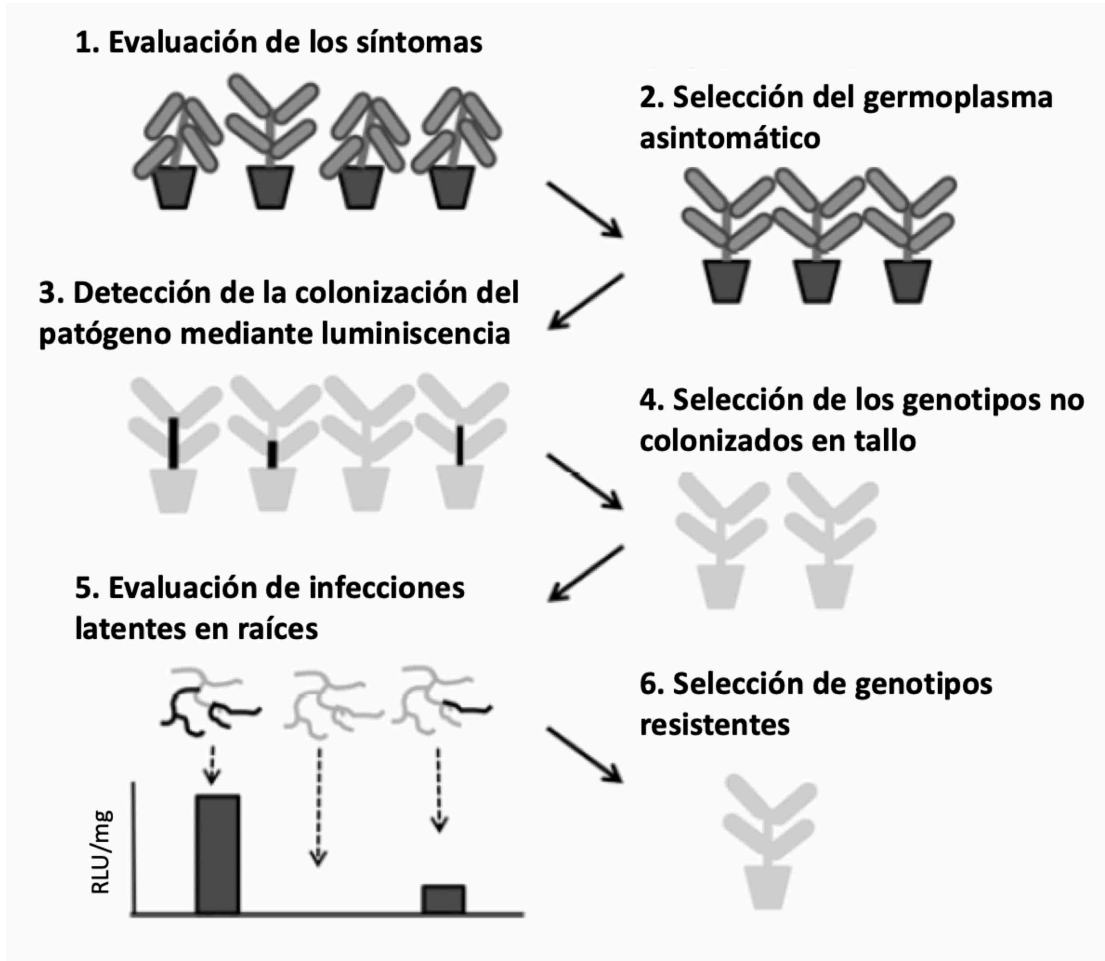


Figura 2.20. Esquema de un programa de mejoramiento utilizando la cepa reportera luminiscente como herramienta en la selección de genotipos resistentes, modificado de Cruz et al., 2014.

En una primera etapa, el germoplasma infectado con la cepa reportera sería evaluado mediante el registro clásico de síntomas. Una vez que los genotipos asintomáticos o con un porcentaje de plantas marchitas bajo son identificados, éstos deben ser evaluados en luminómetro para observar si tienen colonización bacteriana en los tallos, a través de un seguimiento diario. Luego, a los genotipos que fueron seleccionados mediante esta metodología no destructiva, se les extraen las raíces y se evalúa si hay infección latente. Posteriormente, se cuantifica la luminiscencia mediante luminómetro de alta sensibilidad. Este procedimiento podría ser implementado, dado que las metodologías utilizadas son baratas y fáciles de realizar porque no requieren reactivos ni equipamientos sofisticados. Además, es importante destacar que la detección de luminiscencia simplifica la cuantificación de la concentración bacteriana en las plantas infectadas, que normalmente se realiza mediante el procesamiento del tejido, plaqueo y posterior recuento de las ufc.

Este trabajo presenta el potencial uso de las cepas reporteras en el estudio de las interacciones planta-patógeno. Además, la cepa reportera luminiscente podría ser utilizada en el procedimiento propuesto (Figura 2.20) para la selección de germoplasma resistente en el programa de mejoramiento, permitiendo analizar la colonización de la planta mediante una metodología de alto rendimiento que posibilitaría el descarte de genotipos parcialmente resistentes que pueden transportar infecciones latentes en una etapa temprana del programa de selección.

CAPÍTULO 3

**Estudio comparativo de interacción planta – patógeno
en genotipos de papa con diferentes niveles de
resistencia a *Ralstonia solanacearum***

3.1 – INTRODUCCIÓN

3.1 Introducción.

Uno de los principales problemas para alcanzar un manejo racional de las enfermedades que afectan a los cultivos es la carencia de información básica sobre la interacción hospedero-patógeno. Este conocimiento es fundamental para dilucidar los mecanismos de resistencia de la planta y consecuentemente diseñar y evaluar estrategias de control efectivos. El resultado final de una interacción planta-patógeno se manifiesta generalmente por la aparición de síntomas típicos, sin embargo, es sabido que los procesos que ocurren durante las etapas tempranas o inmediatamente previas a la infección son los que definen el éxito de una invasión patogénica (Montesinos et al., 2002). La comprensión de estos procesos es fundamental para avanzar en el control de las enfermedades y en el aumento de la producción de los cultivos de una manera sustentable y eficiente.

En este capítulo se utilizaron diferentes abordajes experimentales para profundizar en el proceso de colonización y distribución de *R. solanacearum* dentro de la planta hospedera, así como en las respuestas de defensa vegetal desencadenadas. Este estudio se realizó sobre genotipos del programa de mejoramiento de papa con diferentes niveles de resistencia seleccionados a partir de las evaluaciones descritas en el Capítulo 2 (Tabla 2.2).

El perfil de distribución y multiplicación del patógeno en los diferentes tejidos de la planta es una información valiosa para los programas de mejoramiento, ya que permite evaluar y seleccionar de forma más eficiente los materiales con mayor potencial de resistencia. Este tipo de estudios ha sido previamente realizado en cultivos de tomate, morrón y tabaco, determinando que la resistencia está asociada con la limitación de la diseminación del patógeno a través del tallo (Grimault and Prior, 1993; Grimault et al., 1994a; Nakaho et al., 2004; Lebeau et al., 2011; Bittner et al., 2016; Kunwar et al., 2018). También se ha reportado la importancia de las barreras físicas, como el fortalecimiento de la pared y la producción de tálides, en limitar la diseminación de *R. solanacearum* en los haces vasculares de la planta (Grimault et al., 1994b; Nakaho et al., 2000). Por otro lado, un estudio reciente realizado en tomate asocia la resistencia a este patógeno con un retardo y restricción espacial en la colonización de los haces vasculares, pero fundamentalmente a nivel radicular (Caldwell et al., 2017).

Dado que no se cuenta con antecedentes de estudio del proceso de infección de *R. solanacearum* en papa, en este trabajo nos propusimos realizar por primera vez el seguimiento de la bacteria en plantas con diferentes niveles de resistencia, mediante el uso de las cepas reporteras de *R. solanacearum* con

actividad fluorescente y luminiscente desarrolladas en el marco de esta Tesis. Ambas cepas se utilizaron para visualizar la bacteria *in planta* y así aportar información sobre el proceso de colonización. El uso de la cepa luminiscente permitió realizar el seguimiento por un método no destructivo, observando a diferentes tiempos la misma la planta a través de un luminómetro y localizando la bacteria en los tejidos aéreos colonizados. Por otro lado, el seguimiento con la cepa reportera fluorescente se realizó a través de observación por microscopía confocal de fluorescencia sobre muestras de raíces y cortes transversales de tallo. Aunque esta metodología requiere la destrucción de la planta para la evaluación, permite observar la bacteria con mayor resolución y explorar detalladamente los tejidos de la planta colonizados por el patógeno. Para poder relacionar la localización de la bacteria con su concentración, y el nivel de resistencia de los genotipos, también se realizaron recuentos del patógeno en los diferentes tejidos.

Para complementar este estudio, se evaluaron respuestas de defensa de la planta inducidas luego de la infección con la bacteria en los genotipos seleccionados. Los mecanismos moleculares subyacentes a las defensas de la planta han sido reportados y discutidos para varios patógenos vasculares, incluyendo *R. solanacearum* (Yadeta and Thomma, 2013; Bae et al., 2015). En este trabajo, se realizaron tinciones histológicas diferenciales para evaluar la deposición de lignina, calosa y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS). También se evaluó la pérdida de electrolitos a través de la membrana celular como un método para cuantificar el estrés biótico inducido en la planta. Por último, se evaluó en estos materiales el perfil de expresión de genes candidatos involucrados en las respuestas de defensa frente a *R. solanacearum*, identificados en trabajos previos realizados en este patosistema (Narancio et al., 2013; Zuluaga et al., 2015).

Parte de los resultados presentados en este capítulo fueron publicados en la revista *Frontiers in Plant Sciences* (Ferreira et al., 2017). Se adjunta el artículo completo en Anexos.

3.2 - OBJETIVOS

3.2 Objetivos.

3.2.1 Objetivo General.

Estudiar el proceso de infección de *Ralstonia solanacearum* y las respuestas de defensa vegetal inducidas en genotipos seleccionados del programa de mejoramiento de papa con diferentes niveles de resistencia a la marchitez bacteriana.

3.2.2 Objetivos Específicos.

- Estudiar el proceso de colonización de *R. solanacearum* en los genotipos seleccionados mediante el uso de cepas reporteras fluorescentes y luminiscentes.
- Determinar la concentración del patógeno en diferentes tejidos de la planta en los genotipos seleccionados.
- Estudiar las respuestas de defensa de la planta inducidas en los genotipos seleccionados luego de la infección con *R. solanacearum* mediante tinciones histológicas diferenciales.
- Evaluar la expresión de genes candidatos de defensa asociados a la respuesta frente a *R. solanacearum* en los genotipos seleccionados mediante cuantificación relativa por RT-qPCR.

3.3 - MATERIALES Y MÉTODOS

3.3 Materiales y Métodos.

3.3.1 Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento.

En este capítulo se utilizaron las cepas reporteras de *Ralstonia solanacearum* UY031 Pps-lux y UY031 Pps-GFP que fueron construidas y validadas como fue descrito en el capítulo 2 (Cruz et al., 2014). Además, se utilizó la cepa de *R. solanacearum* UY031 silvestre para los ensayos de evaluación de las respuestas de defensa mediante análisis de expresión génica por qPCR y tinciones histológicas. El cultivo de *R. solanacearum* se realizó a partir del stock mantenido a -70°C, sembrado en placas de medio Phi con TTC (Kelman, 1954) que se incubaron a 28°C durante 48-72 h. Los cultivos en medio Phi líquido se iniciaron a partir de una colonia aislada con morfología típica, y se incubaron a 28°C con agitación a 150 rpm durante 24 h. Las cepas reporteras se seleccionaron con gentamicina (5 y 75 µg/ml en medio líquido y medio sólido respectivamente). Las suspensiones bacterianas se ajustaron a través de la medida de la densidad óptica mediante espectrometría a 600 nm (OD₆₀₀ de 0,1 corresponde a 10⁸ ufc/ml). La composición y forma de preparación de estos medios se detalla en el Apéndice 1.

3.3.2 Material vegetal y condiciones de crecimiento.

Se utilizaron plantas de *S. tuberosum* cultivar Chieftain (cv. Chieftain) como control susceptible y 4 genotipos derivados del programa de mejoramiento genético de papa de INIA anteriormente seleccionados: 13001.79 (susceptible), 13001.107 (resistencia parcial), 11201.27 (resistencia parcial) y 09509.6 (resistencia parcial) (Tabla 2.2). La generación y multiplicación de las plantas se realizó como fue detallado en el Capítulo 2. Brevemente, las plantas fueron micro-propagadas *in vitro* a partir de un nodo en medio papa multiplicación suplementado con 30g sacarosa/litro (Apéndice 1), y fueron mantenidas a 22°C con ciclos de 16 h luz/8 h de oscuridad por 3-4 semanas. Posteriormente, las plántulas fueron transferidas a almacigueras con sustrato hortícola comercial (TREF) y mantenidas por 2 semanas en invernadero para su aclimatación. Luego las plantas fueron trasplantadas a macetas de aproximadamente 170-cm³ con sustrato hortícola y fueron mantenidas en cámara de crecimiento a 24°C y 65% de humedad relativa con ciclos de 16 h luz/8 h de oscuridad hasta la realización de los ensayos de inoculación.

3.3.4 Ensayos de inoculación.

Para realizar el seguimiento de la bacteria *in planta* se realizó la inoculación en suelo con las cepas reporteras de *R. solanacearum* UY031 Pps-lux y UY031 Pps-GFP como fue detallado en el apartado 2.3.5.2 del Capítulo 2. Brevemente, se realizó la inoculación a nivel de las raíces mediante regado con 40 ml de la suspensión bacteriana en cada maceta, de forma de alcanzar una concentración final de 10^6 ufc/g de suelo (Siri et al., 2011).

Para evaluar los efectos histológicos de la infección de *R. solanacearum*, las plantas se inocularon con la cepa de *R. solanacearum* UY031 mediante el procedimiento descrito anteriormente en suelo o por inyección en tallo, dependiendo del experimento realizado. Para la inoculación en tallo, una gota de 10 μ l de la suspensión bacteriana (10^7 ufc/ml) se colocó en la zona del pecíolo de la tercera hoja contando desde el ápice de la planta, y luego con una aguja se realizó un pequeño orificio para favorecer la penetración bacteriana.

En cada experimento se utilizaron de 3-6 réplicas de cada genotipo crecidas en macetas individuales y en cada experimento se inocularon plantas con suero fisiológico estéril como control negativo. Las plantas fueron distribuidas siguiendo un diseño completamente aleatorio y mantenidas en cámara de crecimiento a 28°C y 65% de humedad relativa con un fotoperíodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad.

3.3.5 Seguimiento del proceso de infección.

3.3.5.1 Seguimiento de *R. solanacearum in planta* mediante detección y cuantificación de luminiscencia.

Para el seguimiento de la bacteria *in planta* mediante luminiscencia se utilizó la cepa reportera UY031 Pps-lux. Se inocularon en suelo plantas de los genotipos seleccionados 13001.79, 13001.107, 11201.27 y del cv. Chieftain. Se realizaron dos experimentos independientes con 6 réplicas de cada genotipo distribuidos al azar.

Luego de la inoculación se realizó el seguimiento de la colonización en los tejidos aéreos. La luminiscencia fue detectada utilizando un luminómetro LAS4000 (Fuji Film) con el modo para detectar quimioluminiscencia, un tiempo de exposición incremental de 2 min y una sensibilidad/resolución seteada en *high binning*. Dado que esta metodología no es destructiva, las plantas fueron visualizadas diariamente

durante 6 días posteriores a la inoculación. Al finalizar la visualización, la luminiscencia fue cuantificada en los diferentes tejidos de la planta. Para ello, se tomaron 2-cm de raíces y tallo de la parte basal y aérea de la planta. Las muestras fueron lavadas y pesadas previamente y la luminiscencia fue cuantificada en luminómetro (Berthold FB 12). Los resultados se expresaron en RLU/por gramo de tejido.

3.3.5.1 Visualización del patógeno *in planta* mediante microscopía confocal de fluorescencia.

Para los ensayos con la cepa reportera fluorescente UY031 Pps-GFP, se inocularon en suelo plantas de los genotipos seleccionados 13001.79, 13001.107, 11201.27, 09509.6 y del cv. Chieftain. Se realizaron 3 experimentos independientes con 3-5 réplicas de cada genotipo distribuidos al azar. La bacteria fue visualizada en raíces y tallos a los 2 y 7 días luego de la inoculación.

En una primera etapa se retiraron las plantas de las macetas y se extrajo todo el sustrato hortícola de las raíces, de modo que el sistema radicular fue observado entero utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon, Eclipse 80i) para localizar las zonas donde la bacteria había colonizado la planta. Las raíces colonizadas fueron seleccionadas para ser observadas posteriormente por microscopía confocal de fluorescencia. Por otro lado, la planta fue desinfectada con hipoclorito 1% durante un min, lavada con agua destilada estéril y finalmente secada con papel absorbente estéril. Luego, utilizando un bisturí estéril, se cortaron segmentos de 2 cm correspondientes a la zona basal y superior del tallo. En cada segmento, se realizaron 6-10 cortes transversales a mano alzada en cada uno de los extremos los cuales se reservaron para la observación microscópica. Las muestras restantes de cada segmento de tallo y de raíces, se pesaron, se procesaron en *buffer* fosfato (Apéndice 2) y se realizaron diluciones seriadas al décimo en suero para cuantificación de la bacteria mediante recuento en placas de medio Phi suplementado con gentamicina.

Los cortes transversales de los tallos y las zonas de las raíces anteriormente seleccionadas para ser observados por microscopía confocal, se colocaron sobre una cámara soporte, anteriormente optimizada y detallada en el Capítulo 2. Las muestras fueron observadas en un microscopio confocal de fluorescencia (Leica, TCS-SP₅), utilizando un láser con una longitud de onda de excitación de 405 nm (UV) y otro con 543 nm (visible).

3.3.6 Tinciones histológicas diferenciales.

3.3.6.1 Evaluación de deposición de lignina.

Los ensayos se realizaron con plantas de los genotipos 09509.6 y cv. Chieftain inoculadas en suelo. Luego de 5 días después de la inoculación se tomaron muestras cortando un segmento de 1 cm de la parte basal del tallo y se fijaron en una solución FAA (50% etanol, 5% ácido acético glacial, 30% formaldehído y 15% agua). Luego las muestras se deshidrataron para poder ser embebidas en parafina y así poder cortar en micrótopo. Para ello, se fueron transfiriendo a soluciones cada vez más concentradas de alcohol y posteriormente a soluciones alcohol/xileno, aumentando periódicamente el porcentaje de xileno de la solución hasta llegar a xileno 100%. A continuación, las muestras de tallo se embebieron en parafina fundida a 65°C, dejando solidificar la parafina para finalmente realizar los cortes por micrótopo (Figura 3.1-A y B) (Johansen, 1940). Se realizaron cortes transversales de 10 µm con micrótopo (Minot) y se colocaron sobre portaobjetos con albúmina de Mayer mantenidos a 50°C en plancha calefactora (Figura 3.1-C). Los preparados se dejaron secar durante 48 h a 37°C y posteriormente se realizó el desparafinado siguiendo el camino inverso al detallado anteriormente para el parafinado y deshidratación. Finalmente, los cortes se tiñeron con safranina alcohólica 80% durante la noche y *fast green* alcohólico 80% (Figura 3.1-D) (Strittmatter, 1979). Para montar se utilizó Bálsamo de Canadá (Biopack) que se dejó secar durante la noche a 60°C y los cortes se observaron en microscopio óptico (Axiolab, Zeiss MC 80).

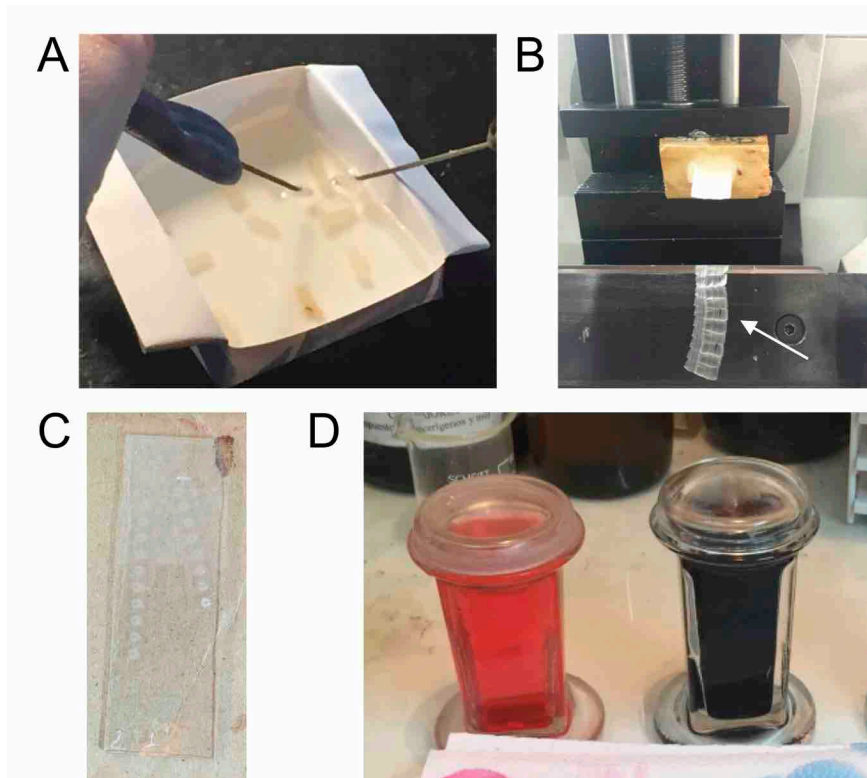


Figura 3.1. Etapas del procesamiento de las muestras de tallo para realización de tinciones histológicas diferenciales. **A:** Cortes de tallo embebidos en parafina fundida. **B:** Micrótopo, la flecha blanca indica los cortes obtenidos uno a continuación del otro. **C:** Cortes montados en portaobjetos con albúmina de Mayer. **D:** Contenedores con safranina y *fast green* donde se colocan los portaobjetos para ser teñidos.

3.3.6.2 Deposición de calosa.

Se utilizaron plantas de los genotipos 09509.6 y cv. Chieftain inoculadas en tallo con la cepa UY031. Luego de 48 h se tomaron muestras cortando 1 cm de la zona inoculada y se dejaron en alcohol 96% durante toda la noche para desteñir. Posteriormente, se realizaron cortes transversales a mano alzada que se colocaron en *buffer* fosfato sódico (0,07 M, pH 9) durante 30 min y se tiñeron con azul de anilina (0,05%) durante 60 min (Daurelio et al., 2009). Finalmente, los cortes se colocaron en portaobjetos, se montaron en una mezcla glicerol-agua (50%) y fueron observados en microscopio de fluorescencia (MIKOBA F320).

3.3.6.3 Detección de especies reactivas del oxígeno (ROS).

Se utilizaron plantas de los genotipos 09509.6 y cv. Chieftain inoculadas en tallo con la cepa UY031. Luego de 24 h después de la inoculación se tomaron muestras cortando 1 cm de la zona inoculada y se

dejaron tiñendo en DAB-HCl (1mg/ml) (Apéndice 2) durante 18 h en oscuridad. Posteriormente, se transfirieron a alcohol 96% para desteñir y se dejaron durante toda la noche (Daurelio et al., 2009). Cuando los fragmentos estuvieron completamente desteñidos, se realizaron cortes transversales a mano alzada y se observaron en microscopio óptico (Axiolab, Zeiss MC 80).

3.3.7 Intercambio de electrolitos a través de la membrana.

Se utilizaron plantas de los genotipos 13001.79, 13001.107, 11201.27, 09509.6 y cv. Chieftain inoculadas en suelo con la cepa UY031. También se inocularon plantas de los mismos genotipos con suero fisiológico estéril para comparar y normalizar los resultados. Luego de 48 h se tomaron muestras cortando 3 discos de 0,5 cm de diámetro de las hojas de cada planta (Figura 3.2-A). Los discos se transfirieron a una placa de microtitulación de 24 pocillos y se dejaron lavando durante 10 min en agua destilada (Figura 3.2-B). Posteriormente, los discos se transfirieron a tubos eppendorf con 500 µl de agua destilada y se dejaron durante 30-60 min para dejar que ocurra el intercambio iónico (la manipulación de las muestras debe ser cuidadosa para no dañar el tejido). Luego se midió la conductividad de 100 µl de la solución donde estaban los discos con conductímetro (COND, LAQUAtwin) (Figura 3.2-C). Las muestras se autoclavaron por 10 min y se volvió a medir la conductividad, este valor se consideró como el 100% del contenido de iones. La conductividad eléctrica (EC) se expresa como porcentaje, siendo el 100% el valor obtenido después de autoclavadas las muestras ($EC (\%) = (EC \text{ tratamiento} / EC \text{ control}) \times 100$).



Figura 3.2. Ensayo de evaluación de intercambio de electrolitos en plantas inoculadas con *Ralstonia solanacearum*. **A:** Planta mostrando donde se tomaron las muestras de hoja. **B:** Muestras de discos de hojas en placa de microtitulación en la etapa de lavado. **C:** Conductímetro portátil donde se midió la conductividad de las muestras.

3.3.8 Cuantificación relativa de genes candidatos de defensa mediante RT-qPCR.

3.3.8.1 Selección de genes candidatos y diseño de primers.

Se partió de una lista de 78 genes expresados diferencialmente frente a la infección de *R. solanacearum* identificados en trabajos previos (Narancio et al., 2013; Zuluaga et al., 2015).

En una primera etapa se realizó la búsqueda de las secuencias de los genes, las cuales se encontraban en bases de datos descritas en los trabajos publicados (POCI web: <http://pgrc.ipk-gatersleben.de/poci> y <https://www.solgenomics.net/>). Se seleccionaron aquellos genes que tuvieron una única copia en el genoma de *S. tuberosum* (disponible en la base de datos <https://www.solgenomics.net/>) y *S. commersonii* (disponible en la base de datos de NCBI publicado en Aversano et al. (2015)). También se contó para el análisis con la secuencia genómica de la accesión de *S. commersonii* 04.02.3, generado por el grupo del Dr. Pablo Esperanza de Facultad de Agronomía (P. Gaiero, comunicación personal). Como resultado se encontró que 69 de los genes evaluados tenían múltiples copias en cada uno de los genomas, por lo cual se decidió continuar la evaluación con los otros 9 genes restantes de copia única (Tabla 3.1).

El diseño de *primers* se realizó sobre las zonas conservadas identificadas a partir del alineamiento de las tres secuencias disponibles para cada gen. De esta forma se apuntó a que los *primers* puedan ser aplicados para el análisis de diferentes genotipos del programa de mejoramiento, provenientes de distintos cruzamientos de *S. commersonii* x *S. tuberosum*. El alineamiento fue realizado con el programa *Geneious R8* (Biomatters). Para el diseño y evaluación de las propiedades termodinámicas de los *primers* se utilizaron los programas *Primer 3 Plus* (Untergasser et al., 2007) y *Vector NTI Advance 11.0* (Invitrogen). Los criterios que se utilizaron para el diseño fueron: tamaño del producto de amplificación de 70 a 150 pb, tamaño de los *primers* próximo a las 20 pb, T_m alrededor de los 60°C, contenido de bases GC del 50% en las secuencias de los *primers* y se descartó la formación de dímeros y horquillas por el mismo *primer* y heterodímeros entre los diferentes *primers* de una misma combinación.

Para normalizar los resultados de expresión relativa de cada uno de los genes seleccionados se utilizaron 3 genes de referencia de expresión constitutiva descritos en bibliografía: el gen del factor de elongación-1 α (EF-1 α), el gen de la β -tubulina y el gen del ARNr 18S (Nicot et al., 2005). Los *primers* utilizados se describen en la Tabla 3.1. Para el gen de referencia EF-1 α se diseñó un nuevo sistema de *primers* con el objetivo de evaluar la contaminación por ADN genómico (ADNg) en las muestras de ADNc obtenidas en

este estudio. Para eso, tomando como molde la secuencia completa del gen EF-1 α , se diseñó un par de *primers* (Ref_EFg) dirigidos a secuencias ubicadas en exones contiguos separados por un intrón. De esa forma, es posible discriminar la amplificación a partir de ADNg o ADNc por diferencias en el tamaño del producto (147 pb o 74 pb respectivamente). Todos los *primers* fueron sintetizados por MacroGen Inc. (Kumchun-ku, Seoul, Korea).

Tabla 3.1. Genes seleccionados y sistemas de *primers* utilizados para la cuantificación relativa mediante RT-qPCR.

Gen	Anotación	<i>Primers</i>	Producto de amplificación (pb)	R ²	Eficiencia de la reacción (%) ^a
1	Ácido Indol-3-acético-amido sintetasa GH3.3	F: 5'-GCACGTCCAGTCCTAACAAG-3' R: 5'-CGACACAGAGAATGGTCTCG-3'	106	0,997	106
2	Proteína Hipotética	F: 5'-CATCCTACAACGAACCAGC-3' R: 5'-GTAGCAGCAACAAGGCTTC-3'	73	0,947	91
3	Proteína Hipotética	F: 5'-CATTTCATGTATGAGTCCACC-3' R: 5'-GGAGGATCCAATACACTTCTG-3'	131	0,996	100
4	Ory s1 (alergeno del polen)	F: 5'-GGTAAGGTGCAAGGACAAGG-3' R: 5'-CACGGGAGCTTAGAATGAAG-3'	104	ND ^b	ND ^b
5	Poligalacturonasa	F: 5'-GGAATAAGTATTGGGAGCTTGG-3' R: 5'-CCTCAAGGTAGCATCATGTAC-3'	81	0,952	99
6	Péptido Fitosulfoquina	F: 5'-CCAAAGGAAGTTGGTAAGGAAG-3' R: 5'-GATGAGCAGCCAAAGTCCTC-3'	82	0,992	94
7	Proteína Hipotética	F: 5'-CGTTTTCGTCCCTACAACAG-3' R: 5'-CATCATCGTCGTCGTCATC-3'	97	ND ^b	ND ^b
8	Proteína Hipotética	F: 5'-CGTTTTCGTCCCTACAACAG-3' R: 5'-CATCATCGTCGTCGTCATC-3'	74	ND ^b	ND ^b
9	Oxido reductasa	F: 5'-GAACTTGTGACGGAGGATTGG-3' R: 5'-CCACAAGGACCCTTTGTTC-3'	89	0,997	93
Ref_EFg	Factor de elongación-1 α	F: 5'-GATTTGCTGCTGCAACAAG-3' R: 5'-CCTTCACAATTCATCGTACC-3'	74	0,998	97
β -tubulina ^c	β -tubulina	F: 5'-ATGTTTCAGGCGCAAGGCTT-3' R: 5'-TCTGCAACCGGGTCATTCAT-3'	101	0,993	107
ARNr 18S ^c	ARNr 18S	F: 5'-GGCATTTCGATTTTCATAGTCAGAG-3' R: 5'-CGGTTCTTGATTAATGAAAACATCCT-3'	101	0,973	108

^a Las curvas de eficiencia están detalladas en el Apéndice 4. ^b ND: No determinado. Los Genes 4, 7 y 8 no lograron ser amplificados con los *primers* diseñados. ^c Los *primers* utilizados para la amplificación de los genes de referencia β -tubulina y ARNr 18S fueron diseñados por Nicot et al. (2005).

3.3.8.2 Procesamiento de muestras para extracción de ARN y síntesis de ADNc.

Se utilizaron plantas de los genotipos 09509.6 y cv. Chieftain, las cuales fueron inoculadas con la cepa UY031 siguiendo el procedimiento de inoculación en suelo descrito anteriormente. También se inocularon plantas de los mismos genotipos con suero fisiológico estéril (condición calibradora). Luego de 24 h posteriores a la inoculación se separaron las raíces de cada planta y se tomaron muestras de 2 cm de la zona basal del tallo. Se analizaron 3 plantas de cada genotipo para cada tratamiento. Luego de recolectadas, las muestras vegetales fueron inmediatamente congeladas y molidas con nitrógeno líquido y almacenadas a -70°C hasta la extracción del ARN.

El ARN total de cada muestra fue obtenido con un kit para extracción de ARN de plantas (Zymo Research, ZR Plant RNA MiniPrep). El ARN extraído se cuantificó utilizando un espectrofotómetro de microgota (Jenway, Genova Nano). Además, se determinó la relación $\text{Abs}_{260/280}$ para evaluar la pureza de las muestras, considerando como muestras de buena calidad aquellas que obtuvieron una relación mayor a 2. Posteriormente, se realizó un tratamiento con la enzima desoxyribonucleasa I (ADNasa I) (Sigma-Aldrich, Dnase I) sobre $1\ \mu\text{g}$ de ARN de cada muestra para eliminar restos de ADNg. La síntesis del ADNc se realizó utilizando el kit SuperScript III First-Strand (Invitrogen). Las muestras obtenidas se diluyeron al cuarto en agua miliQ y se almacenaron a -70°C .

3.3.8.3 Amplificación por RT-qPCR.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en una mezcla de reacción de $10\ \mu\text{l}$ conteniendo $5\ \mu\text{l}$ de Master Mix (Qiagen, Quantinova SYBR Green PCR kit), $0,7\ \mu\text{M}$ de cada *primer* y $2\ \mu\text{l}$ de ADNc (generado a partir de $1\ \mu\text{g}$ de ARNm y diluido al cuarto). La amplificación se llevó a cabo en un equipo de PCR en tiempo real (Corbett Research, Rotor Gene 6000) con el siguiente programa de temperaturas: un primer paso de desnaturalización a 95°C por 2 min y 40 ciclos repetidos de una etapa de desnaturalización a 95°C por 5 seg e hibridación y extensión a 60°C por 10 seg. Al finalizar se realizó una curva de disociación para detectar productos de amplificación no específicos. Para cada réplica biológica se analizaron 2 réplicas técnicas considerando que entre ellas la diferencia de Ct no supere un valor de 0,5 y en cada corrida se incluyeron controles negativos sin ADN (Dorak, 2007; Bustin et al., 2009).

Se validaron las amplificaciones para cada sistema de *primers* a través del análisis de la eficiencia de

amplificación de cada gen de interés y los genes de referencia. Para ello se realizaron diluciones seriadas al cuarto a partir de una mezcla del ADNc de cada una de las muestras (10 µl del ADNc generado a partir de 1 µg de ARNm y diluido al cuarto) hasta obtener 5 puntos para generar una curva de calibración. Se analizaron 3 réplicas técnicas de cada dilución, considerando que entre ellas la diferencia de Ct no podría superar un valor de 0,5. Fueron consideradas validadas aquellas reacciones que obtuvieron entre 90-110% de eficiencia (Dorak, 2007; Bustin et al., 2009).

Los niveles de expresión de cada gen de interés se normalizaron respecto a cada gen de referencia (factor de elongación-1 α , β -tubulina y ARNr 18S). Se utilizó el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen y Livak, 2008) para calcular el cambio en los niveles de expresión entre la condición de estudio (plantas inoculadas con *R. solanacearum*) y condición calibradora (plantas inoculadas con suero fisiológico) para cada gen de interés en los dos genotipos analizados.

3.3.9 Análisis de datos.

Los valores de los replicados de los tratamientos en los diferentes experimentos fueron combinados cuando no hubo diferencias significativas entre ellos. Los resultados de luminiscencia, recuentos en placa y conductividad eléctrica, se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y el índice de Tukey's para comparaciones múltiples con un 95% de confianza. El modelo residual fue usado para chequear la distribución normal de los datos y homogeneidad de varianzas. El análisis estadístico de los resultados de los ensayos de RT-qPCR se realizó utilizando el test no paramétrico de Mann-Whitney con un 95% de confianza. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2009).

3.4 – RESULTADOS

3.4 Resultados.

3.4.1 Caracterización de la resistencia a *R. solanacearum* mediante detección y cuantificación de luminiscencia.

Se utilizó la cepa reportera luminiscente UY031 Pps-lux para realizar un estudio comparativo del proceso de colonización en genotipos del programa nacional de mejoramiento de papa con respuesta diferencial frente a la infección por *R. solanacearum*. En la Figura 3.3 se muestran resultados del seguimiento del patógeno mediante detección de luminiscencia en los tejidos aéreos de cada planta durante los 6 días posteriores a la inoculación. Los tejidos colonizados por la bacteria pueden observarse como zonas oscuras a lo largo del tallo debido a la luminiscencia emitida por la cepa UY031 Pps-lux.

En las plantas de los genotipos susceptibles, 13001.79 y Chieftain, la colonización a nivel del tallo pudo ser detectada a partir de los 4 dpi (Figura 3.3-A y B). Ambos genotipos mostraron síntomas de marchitamiento a los 6 dpi, confirmando la sensibilidad de este método en comparación con el registro visual de síntomas para evaluar el progreso de la enfermedad. A pesar de que ambos genotipos son considerados susceptibles, se observaron diferencias en la extensión de tejido colonizado y la densidad bacteriana, indicando una menor colonización en plantas del genotipo 13001.79 respecto al cv. Chieftain. Por otro lado, las plantas de los genotipos con resistencia parcial, 13001.107 y 11201.27, se mantuvieron asintomáticas y la colonización fue observada únicamente en la zona basal del tallo a los 4 dpi, no observándose aumento de la extensión del tejido infectado en las evaluaciones posteriores (Figura 3.3-C y D).

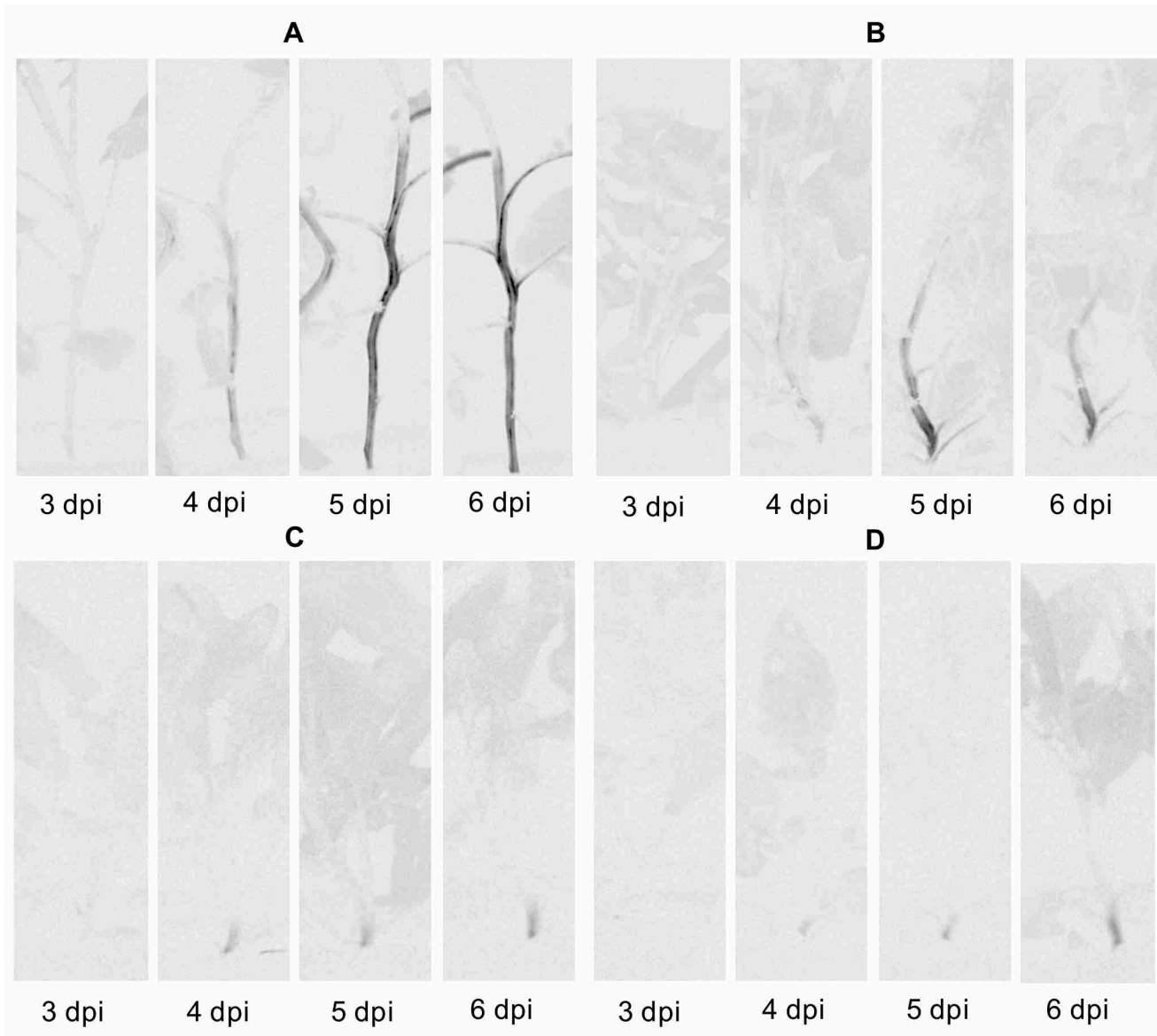


Figura 3.3. Seguimiento de la colonización de *Ralstonia solanacearum* (cepa UY031 Pps-lux) mediante detección de luminiscencia en genotipos con diferentes niveles de resistencia a la marchitez bacteriana. **A:** Genotipo susceptible *Solanum tuberosum* cv. Chieftain. **B:** Genotipo susceptible 13001.79. **C:** Genotipo con resistencia parcial 13001.107. **D:** Genotipo con resistencia parcial 11201.27. Las imágenes fueron tomadas *in vivo* 3, 4, 5 y 6 días post inoculación (dpi). Las zonas grises indican la autoluminiscencia en tallos y hojas debida a la clorofila y las zonas negras son los tejidos colonizados por la bacteria luminiscente.

Las mismas plantas fueron procesadas luego de 6 dpi y la luminiscencia fue cuantificada en un luminómetro en los distintos tejidos (raíz, base y ápice del tallo) (Figura 3.4). La luminiscencia emitida por la cepa reportera se muestra como unidades relativas de luminiscencia por miligramo de tejido fresco (RLU/mg). Esta determinación se utilizó como forma de estimación de la concentración del patógeno en los diferentes tejidos, en base a la correlación reportada en el Capítulo 2.

El genotipo con resistencia parcial 11201.27 mostró mayores valores de luminiscencia en las raíces en comparación con el genotipo susceptible Chieftain ($P=0.0277$), y en los genotipos 13001.79 and 13001.107 se observó un nivel intermedio de colonización. En la zona basal del tallo ambos genotipos susceptibles (13001.79 y Chieftain), mostraron mayores concentraciones bacterianas en comparación con los genotipos con resistencia parcial (13001.107 y 11201.27) ($P=0.0014$).

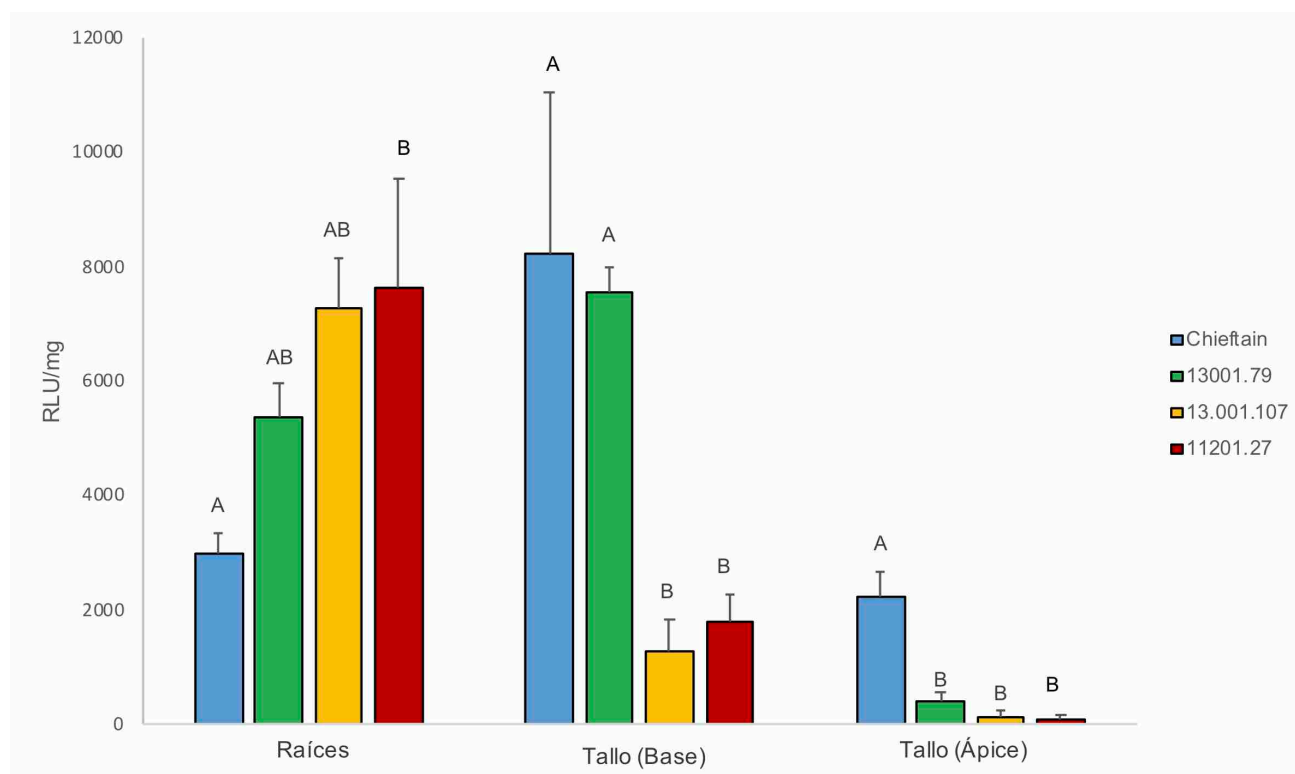


Figura 3.4. Cuantificación de luminiscencia en raíces y tallo de plantas inoculadas con *Ralstonia solanacearum* (cepa UY031 Pps-lux) luego de 6 dpi. La luminiscencia emitida se presenta como unidades relativas de luminiscencia por miligramo de tejido fresco (RLU/mg). Cada columna representa el promedio ($n=6$) de la luminiscencia detectada en raíz y tallo de los genotipos susceptibles (Chieftain y 13001.79) y los genotipos con resistencia parcial (13001.107 y 11201.27) a la marchitez bacteriana. Las columnas con la misma letra dentro de cada parte de la planta (raíces, base y ápice del tallo) no tienen diferencias significativas de acuerdo al análisis estadístico aplicando el *test* de Tukey's ($P=0,05$). Las barras verticales representan el error estándar.

La luminiscencia también se cuantificó en la zona superior del tallo, donde se observó que el genotipo susceptible Chieftain presentó el mayor nivel de colonización, mientras los otros genotipos obtuvieron valores de luminiscencia bajos apenas por encima del nivel umbral.

3.4.2 Caracterización de la resistencia a *R. solanacearum* mediante microscopía confocal de fluorescencia.

En este estudio también se utilizó la cepa reportera fluorescente UY031 Pps-GFP para comparar la colonización de genotipos con diferentes niveles de resistencia a la marchitez bacteriana. El seguimiento en este caso se realizó mediante registro de síntomas (Figura 3.5), observación por microscopía confocal de fluorescencia a nivel de raíces y la zona basal del tallo (Figuras 3.6 y 3.7) y cuantificación del patógeno mediante recuento en placa (Figura 3.8).

A los 2 dpi todas las plantas se mantuvieron asintomáticas y la bacteria no fue observada ni en raíces ni en la zona basal del tallo mediante microscopía confocal. Luego de 7 dpi, los síntomas de marchitamiento solamente fueron evidentes en los genotipos susceptibles (Chieftain y 13001.79) (Figura 3.5). En este tiempo se observó colonización a nivel de raíces en todos los genotipos evaluados, no encontrando diferencias en los patrones de distribución (Figura 3.6). Durante el procesamiento de las muestras en ambos tiempos de observación se observaron un gran número de raíces dañadas, lo que resalta la severidad del procedimiento de inoculación.

Por el contrario, a nivel del tallo sí se observaron diferencias en los patrones de colonización de los genotipos susceptibles y con resistencia parcial. En las plantas control inoculadas con suero fisiológico se observaron bajos niveles de autofluorescencia en la zona de los haces vasculares del tallo (Figura 3.7-A). El análisis microscópico de las plantas susceptibles que ya presentaban síntomas visibles de marchitamiento a los 7 dpi mostró una extensa colonización en todos los haces vasculares, el parénquima y el espacio apoplástico (Figura 3.7-A y C).

Por otro lado, en las plantas asintomáticas del genotipo con resistencia parcial 11201.27, se observó a la bacteria bloqueando un número limitado de vasos xilemáticos y sólo en uno de los haces vasculares observados en distintos cortes (Figura 3.7-D y F). Esta distribución restringida de la bacteria puede estar asociada con una menor afectación en el transporte de agua, lo que explicaría la ausencia de los típicos síntomas de marchitamiento en este genotipo. En los otros genotipos con resistencia parcial con plantas

asintomáticas (13001.107 y 09509.6) no se observó colonización bacteriana en los haces vasculares de los cortes de tallo mediante microscopía confocal (Figura 3.7-E).

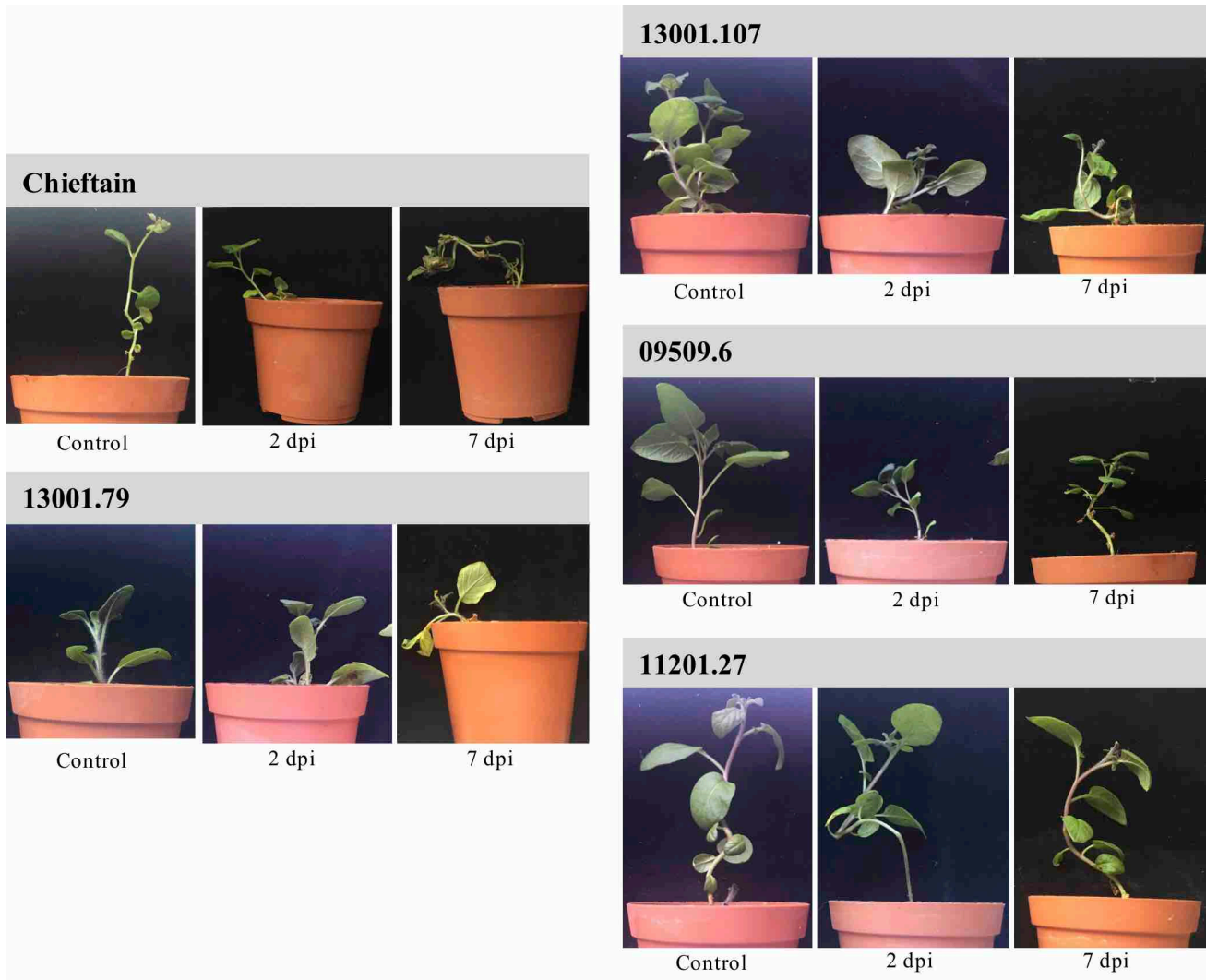


Figura 3.5. Evaluación de síntomas de marchitez bacteriana en plantas inoculadas en suelo con *Ralstonia solanacearum* UY031 Pps-GFP. Las imágenes fueron tomadas a los 2 y 7 dpi en los genotipos susceptibles (Chieftain y 13001.79), y genotipos con resistencia parcial (11201.27 y 13001.107 y 09509.6). Control: plantas de cada genotipo inoculadas con suero fisiológico estéril.

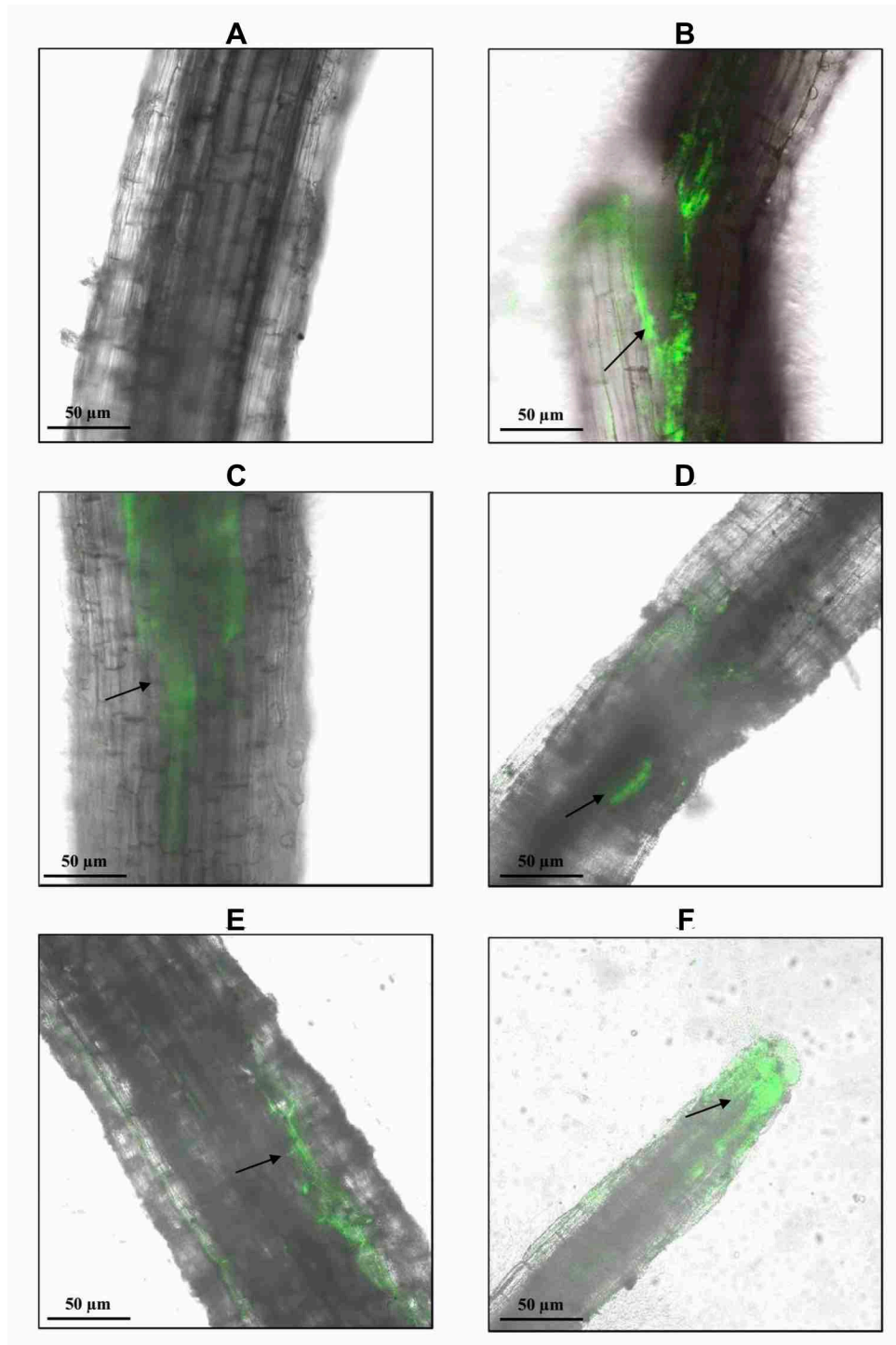


Figure 3.6. Imágenes tomadas con microscopio confocal de raíces de genotipos inoculados en suelo con *Ralstonia solanacearum* UY031 Pps-GFP. Las imágenes fueron tomadas a los 7 dpi con un objetivo 20X. **A:** Planta control inoculada con suero fisiológico. **B:** Control susceptible (cv. Chieftain). **C:** Genotipo con resistencia parcial (13001.107). **D:** Genotipo susceptible (13001.79). **E:** Genotipo con resistencia parcial (09509.6). **F:** Genotipo con resistencia parcial (11201.27). Las flechas negras indican zonas colonizadas por el patógeno.

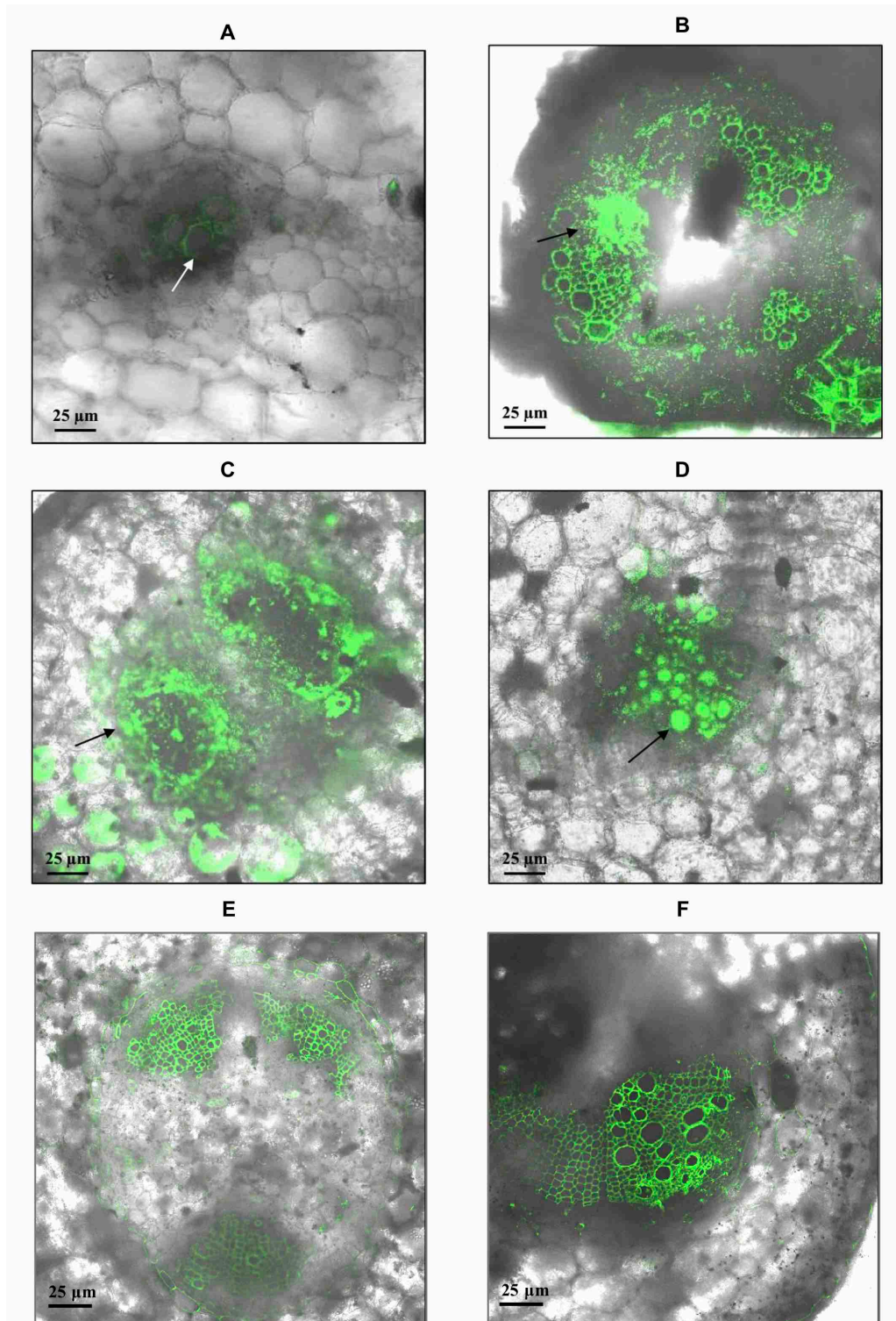


Figure 3.7. Imágenes tomadas con microscopio confocal de cortes transversales de tallo de genotipos inoculados en suelo con *Ralstonia solanacearum* cepa UY031 Pps-GFP. Las imágenes fueron tomadas a los 7 dpi. **A:** Planta control inoculada con suero fisiológico. **B:** Control susceptible (cv. Chieftain). **C:** Genotipo susceptible (13001.79). **D:** Genotipo con resistencia parcial (11201.27) colonizado. **E:** Genotipo con resistencia parcial (09509.6). **F:** Genotipo con resistencia parcial (11201.27) sin colonización. Las flechas negras indican la colonización bacteriana. La flecha blanca indica la autofluorescencia de los haces vasculares.

El análisis de la colonización a través de microscopía confocal permitió realizar observaciones de tipo cualitativo, pero debido a la limitada cantidad de tejido analizado no es una metodología lo suficientemente sensible. Por lo tanto, se usaron muestras de tallos y raíces de las mismas plantas para cuantificar el patógeno mediante recuento en placa. Estos resultados se muestran en la Figura 3.8.

Se detectó que a los 2 dpi todos los genotipos evaluados ya se encontraban colonizados a nivel de raíces y tallo basal. En las muestras de raíces se observó un aumento de la concentración del patógeno a los 7 dpi, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de colonización de los diferentes genotipos en ninguno de los tiempos evaluados. Por otro lado, los genotipos susceptibles mostraron mayores concentraciones del patógeno en tallo en comparación con los genotipos con resistencia parcial. En las plantas del control cv. Chieftain y el genotipo susceptible 13001.79, *R. solanacearum* se multiplicó activamente alcanzando concentraciones de 10^6 ufc/g, a los 2 dpi que luego continuaron aumentando hasta llegar a 10^9 ufc/g a los 7 dpi. En los genotipos con resistencia parcial (13001.107, 11201.27, and 09509.6), no hay un aumento aparente en la concentración de la bacteria en los tallos de los 2 a los 7 dpi. Este resultado es consistente con el hecho de que no se observaron síntomas de marchitamiento en estos genotipos durante este experimento. La concentración del patógeno en tallo encontrada en estos genotipos llegó a un promedio de 10^4 ufc/g, lo cual es probablemente inferior a la cantidad necesaria para desarrollar la enfermedad.

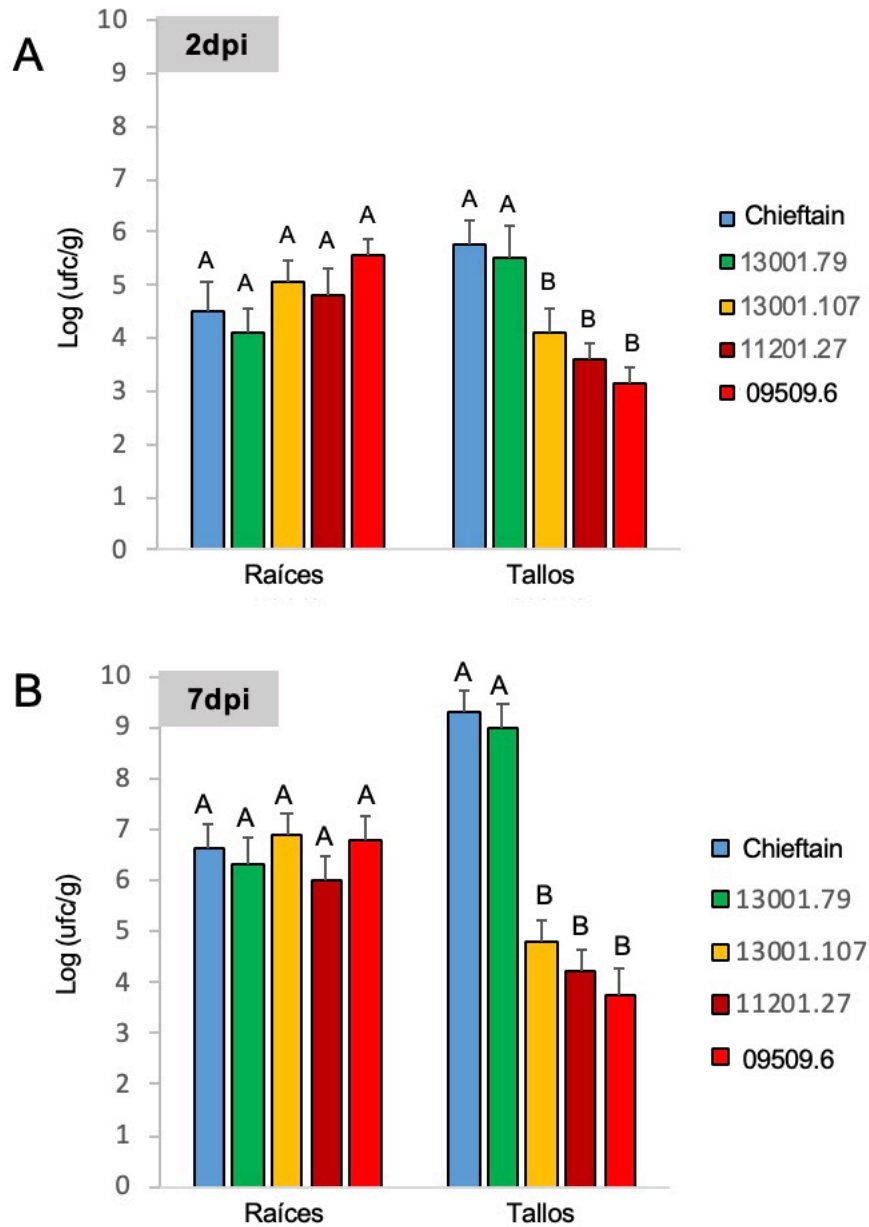


Figura 3.8. Concentración bacteriana en raíces y tallos de genotipos susceptibles y con resistencia parcial inoculados con *Ralstonia solanacearum* UY031 Pps-GFP. Se muestran los resultados luego de 2 días (**A**) y 7 días (**B**) posteriores a la inoculación (dpi). Cada columna representa el promedio de la concentración bacteriana (n=6) determinado mediante recuento en placa de las muestras de tallos y raíces de los genotipos susceptibles (cv. Chieftain y 13001.79) y con resistencia parcial (13001.107, 11201.27, y 09509.6). Las columnas con la misma letra dentro del mismo tipo de muestra no son significativamente diferentes según el *test* estadístico de Tukey's (P=0,05). Las barras verticales representan el error estándar.

3.4.3 Deposición de lignina y calosa en respuesta a la infección con *R. solanacearum*.

Se utilizaron tinciones diferenciales para evaluar cambios histológicos y estructurales inducidos por la infección con *R. solanacearum*. Estas evaluaciones se realizaron sobre plantas del control susceptible cv. Chieftain y del genotipo 09509.6 con resistencia parcial.

Para evaluar la deposición de lignina, se realizaron cortes transversales de tallo de ambos genotipos y se tiñeron con Safranina-*Fast Green*. Esta tinción permite observar la pared secundaria vegetal (formada por lignina y celulosa) en color rojo y la pared primaria (formada por celulosa) en color celeste (Figura 3.9).

Como resultado de la inoculación con *R. solanacearum* se observó una gran división celular con generación de una alta cantidad de nuevos haces vasculares (floema y xilema) en el genotipo con resistencia parcial 09509.6 (Figura 3.9-D). En el control susceptible cv. Chieftain, también se observó hiperplasia de la zona de los haces vasculares luego de la infección con *R. solanacearum* pero en mucho menor proporción (Figura 3.9-C). Además, los tallos del genotipo 09509.6 se caracterizaron por presentar una mayor lignificación con un mayor engrosamiento de los haces xilemáticos en comparación con el genotipo susceptible Chieftain. A su vez, en la Figura 3.10-A se puede observar que hay algunos haces vasculares del genotipo 09509.6 obstruidos con tálides con forma globular. En la Figura 3.10-B se muestra el mismo resultado que en la Figura 3.10-A pero con mayor aumento. Este resultado sugiere que en los haces vasculares infectados del genotipo con resistencia parcial se induce la formación de tálides para ocluir el sistema vascular y limitar el pasaje de la bacteria a los tejidos superiores. En las plantas inoculadas con suero fisiológico y en los genotipos susceptibles inoculados con *R. solanacearum* no se observó este fenómeno.

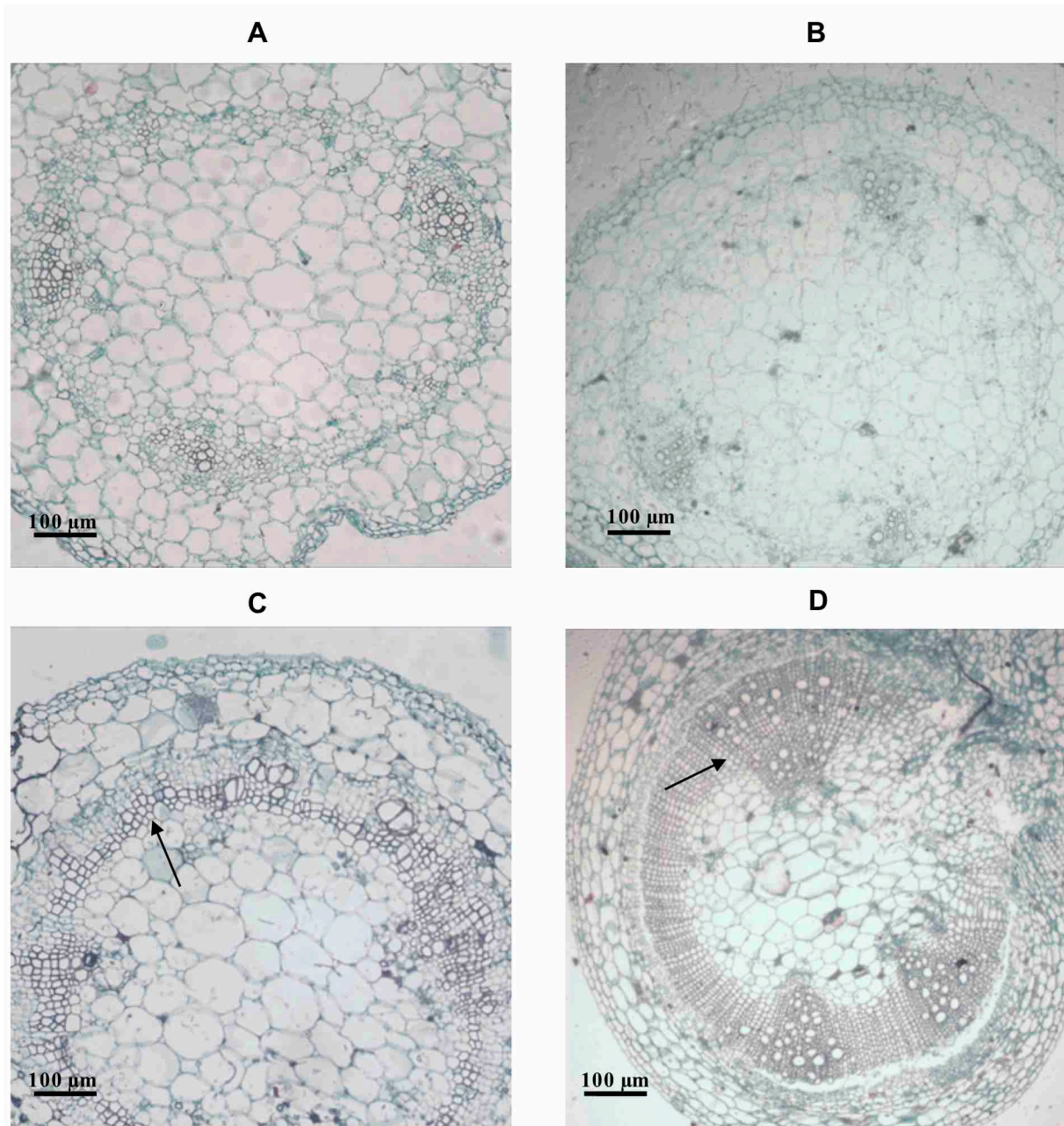


Figura 3.9. Evaluación de la deposición de lignina en tallos teñidos con safranina-*fast green* del control susceptible cv. Chieftain y del genotipo con resistencia parcial 09509.6. Las imágenes fueron tomadas 5 días posteriores a la inoculación (dpi) con *Ralstonia solanacearum* cepa UY031. La safranina tiñe la pared secundaria que contiene lignina de color rojo y el *fast green* tiñe de color celeste la celulosa que compone la pared primaria. **A:** Planta del cv. Chieftain inoculada con suero fisiológico. **B:** Planta del genotipo 09509.6 inoculada con suero fisiológico. **C:** Planta del cv. Chieftain inoculada con *R. solanacearum* 5 dpi. **D:** Planta del genotipo 09509.6 inoculada con *R. solanacearum*. Las flechas negras indican la hiperplasia de los haces vasculares (**C, D**).

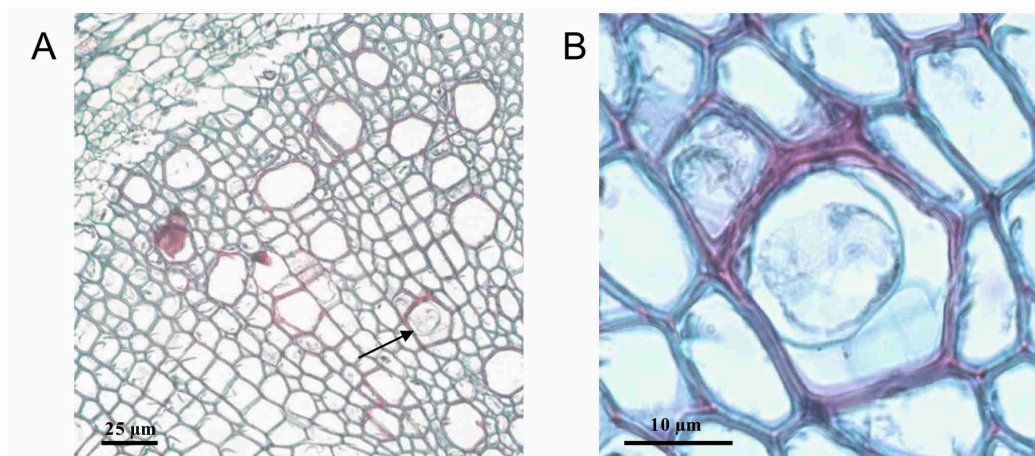


Figura 3.10. Tíldes ocluyendo los haces xilemáticos del genotipo con resistencia parcial 09509.6. Las imágenes fueron tomadas 5 días posteriores a la inoculación (dpi) con *Ralstonia solanacearum* cepa UY031 con un objetivo 20X (A) y 100X (B). La flecha negra indica los haces xilemáticos ocluidos con tíldes (A).

La deposición de calosa fue evaluada en cortes de tallos de los mismos genotipos, utilizando tinción con azul de anilina que permite ver los acúmulos de calosa de color amarillo fluorescente (Figura 3.11). En las plantas infectadas del control susceptible cv. Chieftain se observaron gránulos de calosa dentro de los haces vasculares del floema y en las zonas de comunicación intercelular entre las células del parénquima (Figura 3.11-A, C y E). Estos depósitos de calosa no fueron observados en las plantas control inoculadas con suero fisiológico. En el genotipo con resistencia parcial 09509.6 se observaron abundantes depósitos de calosa tanto en la planta inoculada como en la planta control localizados únicamente en los haces vasculares del floema (Figura 3.11-B, D y F). En las plantas infectadas del genotipo 09509.6 además podemos observar el aumento de la cantidad de haces vasculares debido a la hiperplasia inducida por la infección del patógeno, el mismo efecto observado anteriormente en la Figura 3.9. En este caso, el tejido lignificado se observó como una fuerte autofluorescencia (Figura 3.11-D).

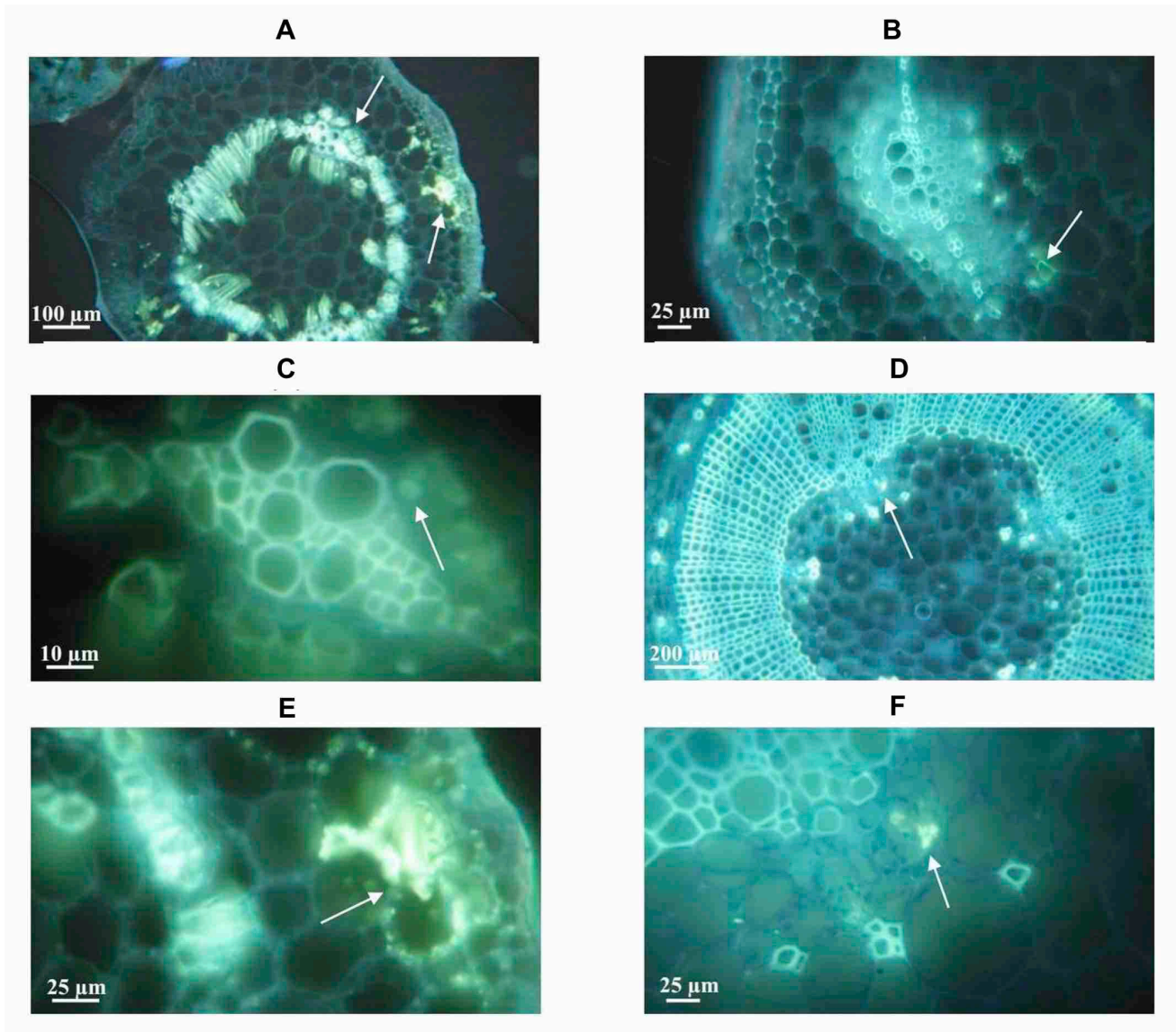


Figura 3.11. Evaluación de la deposición de calosa en tallos teñidos con azul de anilina del control susceptible cv. Chieftain (**A, C, E**) y del genotipo con resistencia parcial 09509.6 (**B, D, F**). Las imágenes fueron tomadas 2 días posteriores a la inoculación (dpi) con *Ralstonia solanacearum* UY031. El azul de anilina permite ver los acúmulos de calosa de color amarillo fluorescente (flechas blancas).

3.4.4 Producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) como respuesta a la infección de *R. solanacearum*.

Para determinar la producción de ROS las plantas fueron teñidas con diaminobencidina (DAB), que forma un precipitado de color marrón con el peróxido de hidrogeno (Figura 3.12). Esta evaluación fue realizada en plantas del control susceptible cv Chieftain y en dos genotipos con resistencia parcial (09509.6 y 13001.107). En el cv. Chieftain no se observaron diferencias en la producción del precipitado entre las plantas control inoculadas con suero fisiológico y las plantas inoculadas con la bacteria (Figura 3.12-A y B). Los genotipos con resistencia parcial 09509.6 y 13001.107 mostraron una mayor producción de ROS luego de la inoculación con el patógeno en comparación con las plantas control (Figura 3.12-C, D, E y F). Este efecto fue más pronunciado en plantas del genotipo 09509.6, en las cuales la producción de ROS se observó de forma más extendida, rodeando los haces vasculares y a nivel del apoplasto (Figura 3.12-D).

En la tabla 3.2 se resumen los resultados de las evaluaciones de las respuestas de defensa de la planta a nivel histológico.

Tabla 3.2. Respuestas de defensa de la planta inducidas por la infección de *Ralstonia solanacearum*.

	Chieftain	13001.107	09509.6
Deposición de lignina	Si	ND	Si (tíldes)
Deposición de calosa	Si	ND	No ^a
ROS	No	Si	Si

^a: No se observó inducción en la deposición de calosa en respuesta a la infección con *R. solanacearum* pero tanto en las plantas no inoculadas como inoculadas se observaron depósitos de calosa. ND: No determinado.

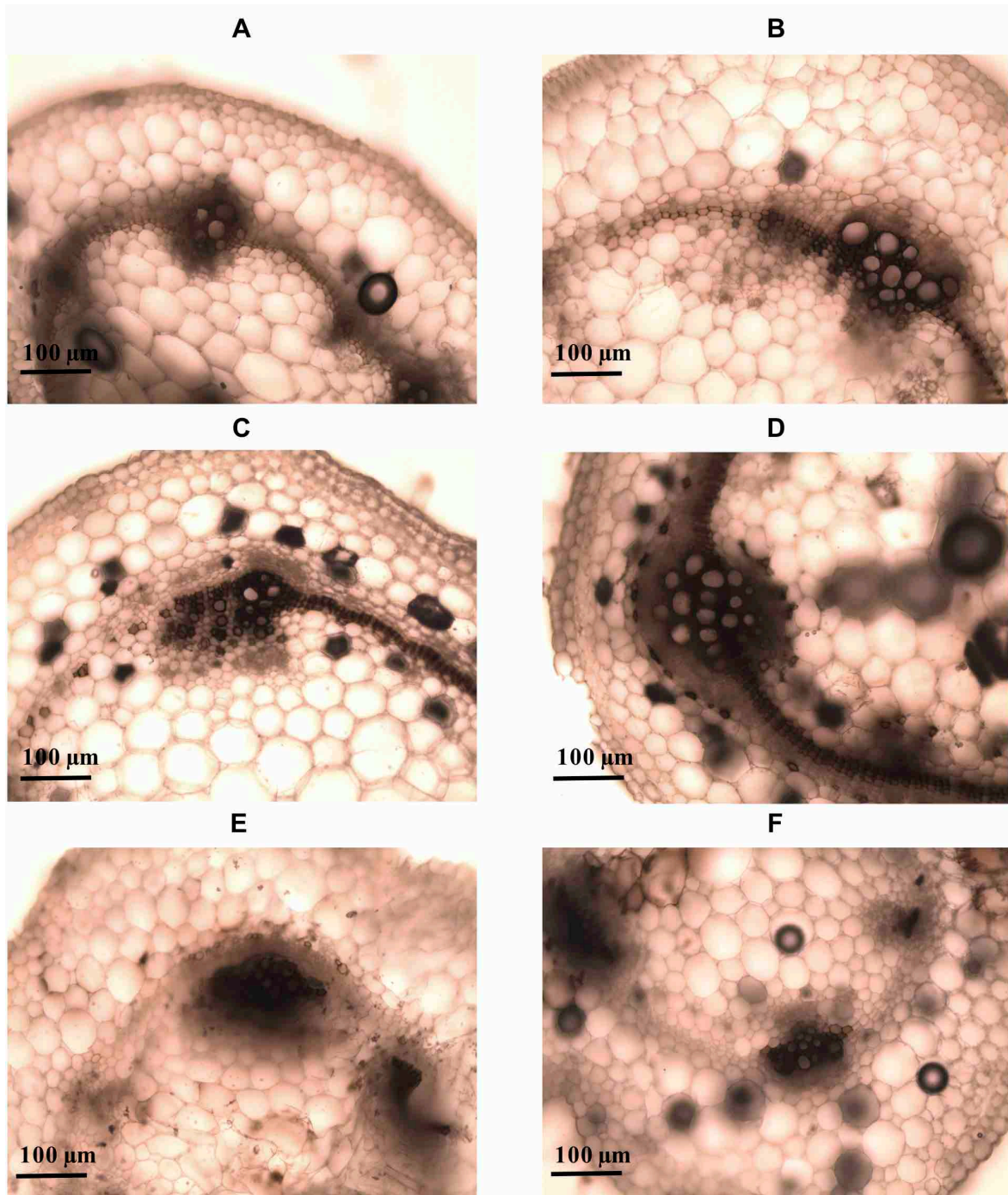


Figura 3.12. Evaluación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en cortes de transversales de tallo del control susceptible cv. Chieftain y de los genotipos con resistencia parcial 13001.107 y 09509.6, luego de dos días posteriores a la inoculación con *Ralstonia solanacearum* UY031. La producción de ROS se evidencia por la aparición de un precipitado marrón. **A:** Planta del cv. Chieftain inoculada con suero fisiológico. **B:** Planta del cv. Chieftain inoculada con *R. solanacearum*. **C:** Planta del genotipo 09509.6 inoculada con suero fisiológico. **D:** Planta del genotipo 09509.6 inoculada con *R. solanacearum*. **E:** Planta del genotipo 13001.107 inoculada con suero fisiológico. **F:** Planta del genotipo 13001.107 inoculada con *R. solanacearum*.

3.4.5 Evaluación del intercambio de electrolitos en respuesta a la infección por *R. solanacearum*.

La conductividad eléctrica (EC) se cuantifica para determinar la permeabilidad de la membrana en la célula vegetal, dado que el tejido bajo estrés conduce a la pérdida de electrolitos. Por lo tanto, una mayor EC indica una mayor severidad en el estrés de la planta a nivel celular. Los resultados de EC se expresaron como porcentaje de electrolitos intercambiados durante el tiempo de evaluación respecto al contenido total de iones (Figura 3.13).

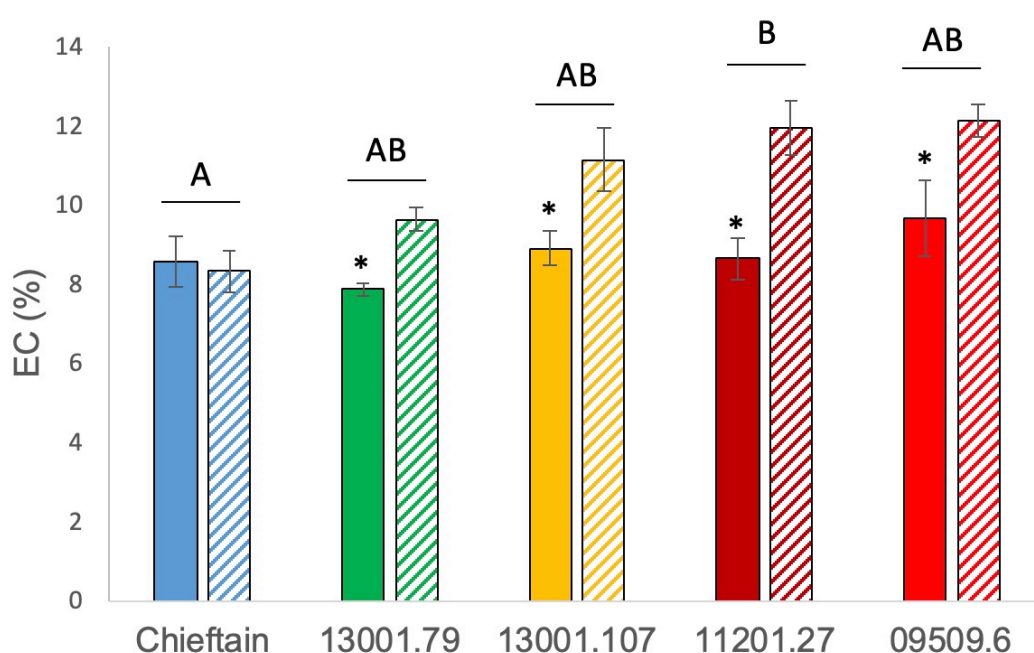


Figura 3.13. Evaluación del intercambio de electrolitos inducido por la inoculación con *Ralstonia solanacearum* UY031. Se representa la conductividad eléctrica expresada (EC) como porcentaje de pérdida para cada genotipo y condición ensayada. Las columnas lisas corresponden a las plantas control inoculadas con suero fisiológico y las columnas rayadas a las plantas inoculadas con *R. solanacearum*. Los asteriscos indican diferencias significativas entre ambos tratamientos para un mismo genotipo ($P < 0.05$). Los genotipos que comparten una misma letra no presentaron un comportamiento significativamente diferente según el índice de comparaciones múltiples de Tukey's ($P = 0,05$).

En el genotipo susceptible Chieftain no se observaron diferencias en el intercambio de electrolitos entre plantas sin inocular e inoculadas con el patógeno. Los otros genotipos evaluados, en cambio, sufrieron aumentos significativos en la pérdida de iones frente a la inoculación con el patógeno. El aumento más importante se observó para el genotipo con resistencia parcial 11201.27 que presentó una diferencia

significativa respecto al control susceptible Chieftain ($P=0,0131$). Los otros genotipos evaluados presentaron un comportamiento intermedio (Figura 3.13).

3.4.6 Expresión de genes candidatos de defensa vegetal.

Se analizaron genes candidatos de defensa seleccionados a partir de estudios transcriptómicos realizados previamente en este patosistema (Narancio et al., 2013; Zuluaga et al., 2015). Se partió de una lista de 78 genes diferencialmente expresados frente a la infección con *R. solanacearum*, de los cuales se seleccionaron 9 genes de copia única en los genomas disponibles de *S. tuberosum* y *S. commersonii* (Tabla 3.1). Algunos de estos genes no lograron ser amplificados con los *primers* diseñados en este trabajo (genes 4, 7 y 8), por lo que no se incluyeron en el análisis. Por otro lado, los 6 genes evaluados mostraron muy buenas eficiencias de amplificación en nuestras condiciones de trabajo (Tabla 3.1, Apéndice 4).

Todos los genes de referencia evaluados mostraron un perfil de expresión constitutiva en los diferentes genotipos y condiciones analizadas. En este trabajo, se presentan los resultados utilizando el gen EF-1 α como gen de referencia, el cual también fue seleccionado en estudios previos como el gen de referencia más estable para evaluar expresión de genes mediante cuantificación relativa por RT-qPCR en plantas de *Solanum tuberosum* (Nicot et al., 2005).

En una primera etapa se evaluaron los perfiles de expresión de las muestras de tallo extraídas a las 24 h luego de la inoculación (Figura 3.14). Se obtuvieron perfiles transcripcionales diferentes frente a la infección por *R. solanacearum* en plantas del control susceptible (cv. Chieftain) y del genotipo con resistencia parcial (09509.6). Por un lado, se observó una inducción significativa en la expresión de los genes candidatos 1, 2 y 3, únicamente en el genotipo susceptible en respuesta a la infección con *R. solanacearum*. Estos mismos genes no modificaron significativamente sus niveles de expresión respecto a plantas del mismo genotipo sin inocular en el genotipo con resistencia parcial. El gen 1 codifica para una enzima involucrada en la producción de una hormona vegetal que juega un rol importante en la promoción del crecimiento vegetal (Vega-Celedón et al., 2016). Los genes 2 y 3 codifican proteínas hipotéticas no caracterizadas. Por otro lado, se observó una inducción significativa del gen 5 frente a la inoculación del genotipo con resistencia parcial 09509.6. Este gen codifica para una poligalacturonasa involucrada en la degradación de la pared celular de la célula vegetal (Yang et al., 2018).

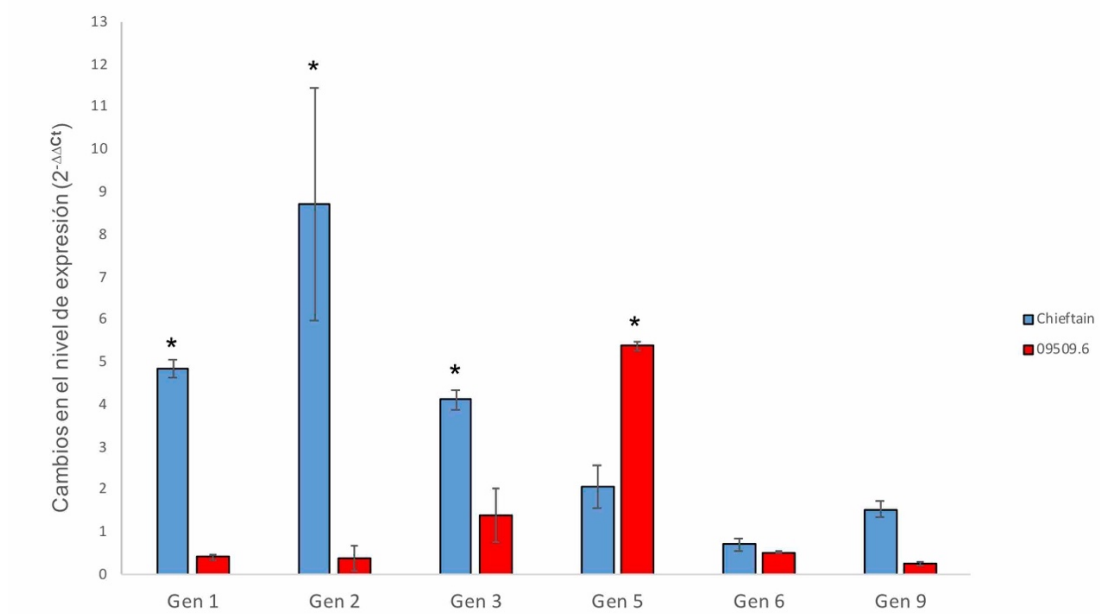


Figura 3.14. Evaluación de los perfiles de expresión de genes candidatos relacionados con la respuesta de defensa frente a la inoculación con *Ralstonia solanacearum* en plantas del control susceptible cv. Chieftain y el genotipo con resistencia parcial 09509.6. La cuantificación relativa de la expresión de cada gen de interés se normalizó respecto al gen de referencia EF-1 α y cada muestra se relativizó respecto a plantas del mismo genotipo inoculadas con suero fisiológico. Las diferencias significativas (*) respecto al control sin estimular fueron calculadas con el test de Mann-Whitney ($p < 0.05$). Las barras verticales representan el error estándar.

3.5 – DISCUSIÓN

3.5 Discusión.

Los métodos que permiten la localización y la visualización de los microorganismos han contribuido a la comprensión de las interacciones entre patógenos y sus plantas hospederas. Las cepas reporteras de *R. solanacearum* UY031 Pps-lux y UY031 Pps-GFP capaces de emitir bioluminiscencia y fluorescencia *in planta* (Capítulo 2; Cruz et al., 2014), fueron aplicadas como herramientas para localizar el patógeno en tejidos infectados de plantas de genotipos con niveles de resistencia contrastante a la marchitez bacteriana. Tal como se detalló en el Capítulo 2, el gen *gfp* y el operón *luxCDABE* fueron integrados en una zona neutral del genoma de *R. solanacearum* bajo el control de un promotor constitutivo del cloroplasto (*psbA*), logrando así una expresión estable y de alta intensidad de ambos sistemas reporteros (Wang et al., 2007; Monteiro et al., 2012b). Ambos sistemas presentan diferentes ventajas y limitaciones que les permiten complementarse en su aplicación. El seguimiento por microscopía de fluorescencia confocal permite analizar con mayor detalle la distribución espacial del patógeno en los tejidos infectados (Kohlmeier et al., 2007). Por otro lado, la detección de bioluminiscencia es más sensible, permite el seguimiento del patógeno *in vivo* en una misma planta a lo largo del tiempo y la cuantificación de la luminiscencia emitida puede ser correlacionada con la concentración bacteriana en los tejidos infectados (Capítulo 2, Cruz et al., 2014).

En este Capítulo se presentaron los resultados de la aplicación de ambas cepas reporteras para la evaluación en líneas de mejoramiento con respuesta diferencial frente a la infección con *R. solanacearum*. Ambas cepas reporteras fueron detectadas fácilmente en las plantas con síntomas visibles de marchitamiento. En los genotipos susceptibles la transición a planta sintomática se relacionó con la multiplicación extensiva del patógeno a lo largo del tallo, alcanzando muy altas concentraciones luego de la inoculación. Esta situación fue correlacionada con la observación de agregados bacterianos de alta concentración en el tejido parenquimático del tallo y además obstruyendo un gran número de haces xilemáticos, causando progresivamente una disminución del pasaje de agua lo que lleva a un descenso de la habilidad de conducción en el sistema vascular de la planta. En las líneas con resistencia parcial, la colonización alcanzó hasta la base del tallo, caracterizándose por una menor concentración y extensión de tejido afectado.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la resistencia a la marchitez bacteriana en papa está relacionada con la capacidad de la planta de restringir la colonización y multiplicación del patógeno,

particularmente limitando la diseminación a lo largo del tallo. Estos resultados son concordantes con observaciones realizadas en otras especies de plantas incluyendo tomate, morrón y *Medicago truncatula* (Grimault et al., 1994a; Nakaho et al., 2000, 2004; Vailleau et al., 2007; Fujie et al., 2010; Du et al., 2017). Las concentraciones alcanzadas a nivel del tallo en los genotipos de papa con resistencia parcial (10^3 - 10^4 ufc/g), son significativamente menores que las reportadas en tallos de plantas de tomate con infección latente (10^5 - 10^8 ufc/g) (Grimault et al., 1994a), implicando que la resistencia en tallos de papa puede ser más eficiente. Otra diferencia en el mecanismo de resistencia entre papa y tomate refiere a la colonización de la raíz. Está postulado que la resistencia en tomate también está asociada a la habilidad de las plantas de restringir la colonización bacteriana a nivel de las raíces, tanto en espacio como en el tiempo (Caldwell et al., 2017). En plantas resistentes de tomate el patógeno invade las raíces de plantas a las 48 h pero en zonas restringidas de los haces vasculares, mientras que en las plantas susceptibles la bacteria invade la raíz a las 24 h y se disemina ampliamente por los vasos xilemáticos (Caldwell et al., 2017). Por el contrario, los resultados obtenidos en papa indican consistentemente que no hay diferencias en los patrones de colonización y distribución del patógeno en las raíces entre genotipos susceptibles y con resistencia parcial. Estos resultados fueron obtenidos a través de la cuantificación de luminiscencia, observaciones mediante microscopía confocal y recuento en placa, sugiriendo que, por lo menos en estos genotipos de papa, la limitación de la infección del patógeno ocurre en una etapa posterior, una vez que el patógeno accede al sistema vascular en la zona basal del tallo. Por otro lado, en genotipos susceptibles y resistentes de morrón se realizó un seguimiento con una cepa reportera luminiscente de *R. solanacearum* y se cuantificó el patógeno en las diferentes partes de la planta (Du et al., 2017). Las concentraciones alcanzadas a nivel del tallo en los genotipos de papa con resistencia parcial (10^3 - 10^4 ufc/g), son similares a las reportadas en tallos de plantas de morrón con infección latente (10^4 - 10^5 ufc/g). En el genotipo susceptible de morrón se detectó la bacteria luminiscente a partir de los 3 dpi y la concentración bacteriana fue 10^7 y 10^9 ufc/g en raíz y tallo respectivamente, mientras que en los genotipos de papa susceptibles fue a los 4 días y 10^6 y 10^9 ufc/g (Du et al., 2017). En este caso, la detección de luminiscencia a tiempos menores en morrón puede deberse al método de inoculación y concentración del inóculo. Cabe destacar los resultados comparables entre estas dos especies de solanáceas.

La resistencia a patógenos vegetales es consecuencia de las respuestas constitutivas e inducidas de defensa de la planta. Las posibles vías de infección y los mecanismos moleculares subyacentes a las

defensas de la planta han sido reportados y discutidos para varios patógenos vasculares, incluyendo *R. solanacearum* (Yadeta and Thomma, 2013; Bae et al., 2015). La pared de la célula vegetal es una de las primeras barreras estructurales que los patógenos deben atravesar para poder infectar y colonizar los tejidos de la planta (Miedes et al., 2014). Además, los patógenos también deben degradar la pared celular para utilizarla como fuente de nutrientes para su crecimiento una vez dentro de la planta hospedera. Las plantas han desarrollado mecanismos especializados para detectar la presencia de los patógenos y censurar la integridad de la pared celular. El reconocimiento de los patógenos induce un remodelado de la pared celular para restringir la colonización y diseminación del patógeno, esto es necesario para controlar la enfermedad (Bellincampi et al., 2014). Este proceso involucra cambios químicos y estructurales, incluyendo la deposición de lignina, deposición de calosa, entrecruzamiento de las proteínas de la pared celular, producción de especies reactivas del oxígeno y compuestos antimicrobianos. En cultivares de tomate con resistencia a la marchitez bacteriana, las barreras físicas están involucradas en la diseminación del patógeno. En el cultivar resistente Caraibo se encontraron tílides ocluyendo haces xilemáticos contiguos colonizados por *R. solanacearum* (Grimault et al., 1994b). Por otro lado, la formación de tílides no fue inducida en plantas de tomate infectadas de otro cultivar resistente (L S-89) (Nakaho, 1997). En este cultivar, la prevención de la diseminación del patógeno se asoció con el fortalecimiento de la pared celular y las membranas de los poros, y también con la acumulación de materiales densos en los haces y alrededor de las células del parénquima (Nakaho et al., 2000, 2017). En este trabajo, el genotipo con resistencia parcial 09509.6 mostró cambios estructurales significativos en respuesta a la inoculación en suelo con *R. solanacearum*. Se observó división celular con generación de alta cantidad de nuevos haces vasculares, deposición de lignina y engrosamiento de los haces xilemáticos. Además, en plantas infectadas de este genotipo se observaron varios haces ocluidos con tílides con forma circular. Este tipo de tílides resulta de la invasión de células del parénquima adyacentes a los haces xilemáticos, probablemente para prevenir la diseminación del patógeno dentro del sistema vascular de la planta (De Micco et al., 2016).

La deposición de calosa y la producción de ROS también forman parte de la primera línea de respuestas en la defensa de la planta (Stone and Clarke, 1992; Lamb and Dixon, 1997). La calosa es un polímero donde compuestos antimicrobianos son depositados y luego son liberados como defensas químicas en puntos específicos (Luna et al., 2011). Aunque la deposición de calosa contribuye a la inmunidad de la

planta contra muchos fitopatógenos, ha sido reportado que estos depósitos de calosa fueron también encontrados a nivel de los sitios de entrada del patógeno (Aist, 1976; Voigt, 2014). En nuestro trabajo, no se observaron diferencias significativas en la deposición de calosa entre las plantas inoculadas con la bacteria y las plantas inoculadas con suero fisiológico en los genotipos con resistencia parcial, los depósitos de calosa fueron abundantes en ambos tratamientos. Este resultado sugiere que esta deposición de calosa constitutiva en plantas del genotipo con resistencia parcial puede contribuir al fortalecimiento de la pared celular previniendo la diseminación del patógeno desde la entrada del patógeno a los tejidos de la planta. Este resultado se puede relacionar con resultados encontrados en plantas de tomate, donde se comparó la actividad proteica en el apoplasto de genotipos susceptibles y resistentes, antes y después de inocular con *R. solanacearum*. En la variedad susceptible la actividad proteica mostró mayores cambios luego de inocular con la bacteria, sugiriendo que el genotipo resistente puede estar más preparado para enfrentar al patógeno en su estado basal (Planas-Marques et al., 2018). La producción de ROS puede ser inducida como respuesta de varios tipos de estrés biótico y abiótico. Se ha reportado que las ROS podrían prevenir el progreso de la enfermedad, causando directamente la muerte del patógeno o promoviendo el fortalecimiento de la pared celular a través del entrecruzamiento de glicoproteínas y fenoles (Thordal-Christensen et al., 1997; Brown et al., 1998; Torres et al., 2006). En tomate, mayores niveles de producción de ROS y deposición de lignina en la pared celular promovieron la resistencia a la marchitez bacteriana (Mandal et al., 2011). Los resultados obtenidos, muestran una producción de ROS inducida luego de la infección con *R. solanacearum* en los genotipos con resistencia parcial. Sin embargo, sería necesaria una evaluación cuantitativa de la producción de ROS a lo largo del tiempo incluyendo más genotipos para determinar con mayor precisión las implicaciones de esta respuesta de defensa de la planta.

La respuesta de defensa de la planta frente a un patógeno puede generar inestabilidad en la membrana y pérdida de su integridad, lo que genera una pérdida de electrolitos. Una metodología para evaluar la integridad y el daño de la membrana de la célula vegetal es la medida de la pérdida de iones en muestras de hojas (Bach-Pages and Preston, 2018). En el genotipo susceptible y en los genotipos parcialmente resistentes evaluados en este trabajo, se observaron diferencias significativas en el intercambio iónico como respuesta de la inoculación con *R. solanacearum*, con excepción del control susceptible cv. Chieftain. En uno de los genotipos con resistencia parcial (11201.27) se observó un intercambio de iones

significativamente mayor frente a la inoculación con el patógeno, en comparación con el control susceptible. Estos resultados sugieren que en estas plantas con resistencia parcial existe un reconocimiento del patógeno que se refleja en un aumento del intercambio de electrolitos a través de la membrana. Este estado de estrés en la planta podría inducir a su vez otras respuestas de defensa frente a la bacteria, que expliquen los mayores niveles de resistencia observados. Los resultados encontrados en este trabajo son concordantes con estudios en plantas de morrón, donde se ha demostrado que una mayor resistencia de la planta frente a la infección con *R. solanacearum* aumenta el intercambio iónico, induce la respuesta de hipersensibilidad y aumenta la acumulación de H₂O₂ (Shen et al., 2016; Mou et al., 2017; Noman et al., 2018).

Otra evaluación realizada en este trabajo fue el estudio de la expresión de genes relacionados con las respuestas de defensa de la planta. De los 6 genes estudiados, 2 representan proteínas hipotéticas (genes 2 y 3), 2 están involucrados en la vía metabólica de las auxinas (genes 1 y 6), el gen 5 codifica para una poligalacturonasa que participa en la síntesis de la pared de la célula vegetal y el gen 9 codifica para una oxidoreductasa involucrada en la respuesta frente a las especies reactivas del oxígeno (Torres et al., 2006; Zuluaga et al., 2015; Yang et al., 2018).

Los cambios en los niveles de expresión relativa de estos genes asociados a la infección con *R. solanacearum* en comparación con los controles sin inocular, sugieren perfiles transcripcionales diferentes en plantas del control susceptible cv. Chieftain y de la línea con resistencia parcial 09509.6 (Figura 3.13). El mayor nivel de inducción se observó para el gen 2 en el caso del genotipo susceptible, alcanzando un aumento de hasta 8 veces en plantas inoculadas con *R. solanacearum* respecto a las plantas control sin inocular. Este gen corresponde a un gen conservado de función desconocida, que también fue inducido a nivel de raíces en plantas de *S. commersonii* inoculadas con *R. solanacearum*, según los resultados de un análisis transcriptómico previo por RNA-Seq (Zuluaga et al., 2015). Para el gen 3 se obtuvieron resultados similares, aunque con un nivel de inducción menor. Estos genes, sin embargo, no modificaron su nivel de expresión en tallo frente a la infección con *R. solanacearum* en el genotipo con resistencia parcial, lo que sugiere la participación de las proteínas codificadas por estos genes en determinar una mayor susceptibilidad y desarrollo de la enfermedad. Dentro del mismo tipo de respuesta, se encuentra también el gen 1 que codifica para la enzima ácido indol-3-acético-amido sintetasa (GH3.3), una enzima responsable de la conjugación de la auxina ácido indol acético con aminoácidos. Las auxinas son

hormonas vegetales que regulan el desarrollo y el crecimiento de la planta, pero que también participan en modulación de las respuestas de defensa frente a patógenos (Kunkel y Harper, 2018). Por otro lado, se ha reportado que varios patógenos producen auxinas durante la interacción con la planta hospedera como estrategia para promover la infección (Cerboneschi et al., 2016; McClerklin et al., 2018). Este gen fue inducido en *Arabidopsis thaliana* por la infección de varios patógenos principalmente luego de las 24 hpi. Además uno de los productos de esta enzima también demostró participar en el desarrollo de la enfermedad a través de la regulación de la expresión de genes relacionados con la virulencia del patógeno (Gonzalez-Lamothe et al., 2012). En los genotipos de papa evaluados en este trabajo se observó una inducción significativa de este gen en el genotipo susceptible Chieftain luego de la inoculación, mientras que en el genotipo con resistencia parcial 09509.6 su expresión se mantuvo invariable respecto a plantas del mismo genotipo sin inocular. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en trabajos previos en los que se observó la inducción a nivel de raíces en genotipos de *S. commersonii* frente a la infección con *R. solanacearum* (Zuluaga et al., 2015).

Por otro lado, el gen 5 fue inducido por la infección con *R. solanacearum*, únicamente en el genotipo con resistencia parcial, mostrando un aumento en los niveles de expresión cercano a 6 veces respecto a plantas de este genotipo sin inocular. Este gen codifica para una enzima poligalacturonasa, que participa de la degradación, modificación y ensamblado de los polímeros de pectina que forman la pared de la célula vegetal (Handfield y Bennett, 1998). También se ha reportado que *R. solanacearum* es capaz de producir 3 poligalacturonasas las cuales funcionan como factores de virulencia y son liberadas para degradar la pared celular y favorecer la penetración e invasión de los tejidos (Schacht et al., 2011; Digonnet et al., 2012). En respuesta a estas enzimas hidrolíticas generadas por los patógenos, las plantas hospederas pueden desarrollar proteínas inhibidoras de poligalacturonasas. En plantas de tomate con diferente resistencia a *R. solanacearum* se evaluó la expresión de estas proteínas inhibidoras y se observó una expresión constitutiva sin diferencias significativas entre los tratamientos (plantas control y plantas inoculadas) y los genotipos con diferentes niveles de resistencia a la marchitez bacteriana (Schacht et al., 2011). En este trabajo, la inducción de la expresión de este gen en el genotipo con resistencia parcial podría asociarse a una respuesta de la planta frente a la virulencia de la bacteria para generar de manera más rápida las enzimas inhibidoras de poligalacturonasas.

También se analizaron otros dos genes candidatos que en las condiciones ensayadas no presentaron

diferencias significativas entre los niveles de expresión de las plantas inoculadas respecto a las plantas control sin inocular. El gen 6 codifica para un péptido fitosulfoquina que actúa como factor de crecimiento promoviendo la proliferación celular y además se ha reportado que actúa inhibiendo la PTI en *A. thaliana* cuando es infectada por patógenos biotróficos (Amano et al., 2007; Igarashi et al., 2012; Mosher et al., 2013; Rodiuc et al., 2016). Los resultados obtenidos en estudios previos (Zuluaga et al., 2015), revelaron la inducción de este gen en raíces de plantas de los genotipos de *S. commersonii* infectados con *R. solanacearum*. Los resultados previos obtenidos para este gen no se pudieron validar en las condiciones utilizadas en este estudio. Para lograrlo, se podría analizar el perfil transcripcional de a diferentes tiempos luego de la inoculación para determinar si cumple un rol en la interacción mediante inhibición de la inmunidad de la planta. Por último, el gen 9 codifica para una oxidoreductasa que forma parte de un sistema antioxidante que según los resultados obtenidos en un genotipo con resistencia parcial de *S. commersonii* podría estar participando en la protección frente a las ROS generadas en la explosión oxidativa asociadas a la infección con este patógeno (Narancio et al., 2013). A su vez las ROS pueden ser generadas como una respuesta para controlar el progreso de la enfermedad y fortalecer la pared de la célula vegetal (Camejo et al., 2016).

En este capítulo mostramos que los genotipos con resistencia parcial de papa no desarrollaron síntomas, aunque presentaron infecciones latentes en raíces y la base del tallo, con concentraciones bacterianas altas o parcialmente altas. Nuestros resultados sugieren que la restricción de la multiplicación del patógeno en el tallo de los genotipos con resistencia parcial puede ser consecuencia de respuestas de defensa de la planta, ya sea a través de cambios estructurales constitutivos como inducidos o respuestas bioquímicas. Sin embargo, muchos aspectos de la interacción planta-patógeno y las consecuencias de las infecciones latentes en estos genotipos con resistencia parcial deben continuar siendo evaluados. Este trabajo resalta el potencial de los genotipos con resistencia parcial seleccionados como recurso genético para futuros cruzamientos del programa de mejoramiento y para comprender la resistencia a *R. solanacearum* en papa.

CAPÍTULO 4

Evaluación del efecto del calcio sobre la virulencia de *Ralstonia solanacearum* y la resistencia a la marchitez bacteriana en papa.

4.1 - INTRODUCCIÓN

4.1 Introducción.

Los micro- y macro-nutrientes minerales son esenciales para una variedad de funciones celulares y están bajo un estricto control homeostático debido a que por otro lado pueden resultar tóxicos cuando se encuentran en altas concentraciones. Los elementos minerales son requeridos tanto por bacterias como por las plantas. Por eso, las bacterias patógenas han desarrollado estrategias para extraer del hospedero determinados elementos. También se han descrito respuestas de defensa que involucran la limitación de minerales en el sitio de infección o la intoxicación del patógeno con elementos específicos (Hood y Skaar, 2012).

Actualmente, es posible determinar el contenido mineral y composición de elementos trazas de un organismo vivo, lo cual está definido como ionoma. Los estudios ionómicos requieren de la aplicación de tecnologías de análisis elemental altamente sensibles como por ejemplo la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) y la espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Estas metodologías permiten obtener información del estado funcional de un organismo en diferentes condiciones (Salt et al., 2008). En el caso de las plantas el ionoma puede estar afectado por varios factores, incluyendo la especie, la variedad, el órgano y el ambiente que la rodea (Watanabe et al., 2016).

Como fue descrito en el capítulo 1 *R. solanacearum* coloniza los haces vasculares de xilema de raíz y tallo. Estos haces vasculares están formados por una red de tubos metabólicamente inertes que transportan la savia xilemática, la cual ha sido descrita como una solución pobre en nutrientes, que transporta agua y minerales desde las raíces a las zonas aéreas de la planta. El flujo del xilema dispersa pasivamente las células planctónicas de *R. solanacearum* hacia arriba. Adicionalmente, *R. solanacearum* tiene dos formas de movimiento activo, la movilidad tipo *swimming* mediada por el flagelo y la movilidad tipo *twitching* mediada por el pili tipo IV. La bacteria se mueve sobre las superficies con la movilidad tipo *twitching* y ésta le permite moverse hacia abajo en los haces vasculares de la planta en contra del flujo de la savia xilemática. La adhesión de la bacteria es facilitada por el pili tipo IV, lectinas (proteínas que enlazan azúcares) y adhesinas. El proceso de adhesión está también influenciado por el pH, temperatura y las propiedades fisicoquímicas de la superficie de la planta hospedera como la superficie de las raíces y las paredes de los haces vasculares. A su vez, las células adheridas pueden crecer en agregados

formando *biofilms* que restringen el flujo de la savia xilemática, lo que lleva al marchitamiento de la planta (Lowe-Power et al., 2018a; Lowe-Power et al., 2018b).

El *quorum sensing* bacteriano es una herramienta de comunicación que coordina el comportamiento basado en la densidad celular. Las bacterias producen y secretan señales que son pequeñas moléculas que difunden. Cuando la concentración bacteriana aumenta las señales del *quorum sensing* aumentan hasta llegar a un umbral que activa una cascada de señales que reprograman la célula transcripcionalmente y fenotípicamente. El *quorum sensing* asegura que los factores de virulencia sean producidos cuando es beneficioso para la comunidad bacteriana y también puede activar subpoblaciones de la comunidad para ajustar rápidamente un estilo de vida diferente (Papenfort et al., 2016). El principal sistema de *quorum sensing* de *R. solanaceum* involucra el regulador transcripcional PhcA, cuando suficientes señales son acumuladas, PhcA es activado y dispara la expresión de factores de virulencia como el EPS, celulasas e inhibe sideróforos y la movilidad tipo *swimming* (Genin y Denny, 2012).

Por otro lado, las condiciones de flujo pueden dificultar la movilidad bacteriana, diluir señales moleculares extracelulares y alterar la adhesión a superficies. Sin embargo, el flujo también puede beneficiar a los microorganismos aportándole nutrientes, quitándole moléculas innecesarias y promoviendo otros mecanismos de adhesión (Lowe-Power et al., 2018b). *R. solanaceum* coloniza el sistema vascular de la planta hospedera y sobrevive dentro de los haces xilemáticos en condiciones de flujo continuo, por esta razón el crecimiento de la bacteria fue analizado en este trabajo en cámaras de microfluído bajo condiciones de flujo. Estos dispositivos son utilizados como haces vasculares artificiales para reproducir los fenómenos que ocurren dentro de la planta, con la ventaja que permiten el seguimiento en tiempo real mediante observaciones microscópicas (Cogan et al., 2013).

4.2 - OBJETIVOS

4.2. Objetivos.

4.2.1 Objetivo General.

Determinar si los minerales presentes en la savia xilemática y en tejidos vegetales tienen un efecto sobre los procesos de crecimiento y virulencia de *Ralstonia solanacearum* durante su interacción con plantas de papa como hospedero.

4.2.2 Objetivos Específicos.

- Analizar el ionoma de la savia xilemática, hoja, tallo y raíz de genotipos de papa con diferentes niveles de resistencia a marchitez bacteriana e identificar minerales potencialmente asociados con la resistencia observada.
- Optimizar las condiciones para el cultivo del patógeno bajo condiciones de flujo en cámaras de microfluído.
- Evaluar el efecto de los minerales relevantes identificados, sobre el crecimiento y actividades asociadas a la virulencia de *R. solanacearum*.

4.3 - MATERIALES Y MÉTODOS

4.3 Materiales y Métodos.

4.3.1 Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento.

En este capítulo se utilizaron las cepas de *R. solanacearum* UY031 (filotipo IIB, secuevar 1), *R. pseudosolanacearum* GMI1000 (filotipo I, secuevar 18). También se utilizaron las cepas reporteras fluorescentes UY031 Pps-GFP (capítulo 2) y GMI1000 Pps-GFP (Monteiro et al., 2012b). El cultivo de las cepas se realizó a 28°C en placas de medio Phi con TTC (Kelman, 1954), en medio casaminoácidos-peptona-glucosa (CPG) y en medio mínimo suplementado con glucosa al 0,2% (MM) (Boucher et al., 1985; Khokhani et al., 2017). Cuando se utilizaron los medios sólidos las placas fueron incubadas durante 48-72 h, los tiempos de cultivo en medio líquido dependieron de cada experimento realizado. Las cepas reporteras se incubaron en las mismas condiciones sumando el agregado de gentamicina (5 y 75 µg/ml en medio líquido y medio sólido respectivamente). Las suspensiones bacterianas para los diferentes ensayos se ajustaron a través de la medida de la densidad óptica mediante espectrometría a 600 nm (OD₆₀₀ de 0,1 corresponde a 10⁸ ufc/ml). La composición de estos medios se detalla en el Apéndice 1.

4.3.2 Material vegetal y ensayos de inoculación.

Se utilizaron plantas de *S. tuberosum* cultivar Chieftain (cv. Chieftain) (control susceptible) y 2 genotipos derivados del programa de mejoramiento genético de papa de INIA seleccionados anteriormente según se describe en el Capítulo 2 de esta tesis: 13001.79 (susceptible) y 09509.6 (parcialmente resistente). Las plantas fueron micro-propagadas *in vitro* y aclimatadas como se describe en el apartado 2.3.2. Luego de 4-6 semanas se trasplantaron a macetas de aproximadamente 170-cm³ con sustrato hortícola y se mantuvieron en cámara de crecimiento a 24°C y 65% de humedad relativa con ciclos de 16 h luz/8 h. Los ensayos de inoculación se realizaron siguiendo el procedimiento de inoculación en suelo con daño de raíces descrito anteriormente. En cada ensayo se utilizaron de 3-10 réplicas de cada genotipo y se inocularon plantas con suero fisiológico estéril como control negativo. Las plantas inoculadas fueron mantenidas en cámaras de crecimiento a 28°C y 65% de humedad con un fotoperíodo de 16 h de luz/8 h de oscuridad.

4.3.3 Procesamiento de muestras para cuantificación de metales.

Se obtuvieron muestras de diferentes tejidos (hoja, tallo y raíces) a partir de plantas de los genotipos seleccionados. Las muestras se lavaron abundantemente con agua corriente para eliminar los restos de tierra, se desinfectaron con hipoclorito de sodio 1% por 1 min, luego se lavaron con agua destilada estéril, se secaron en estufa a 65°C hasta quedar crujientes e inmediatamente se molieron y pesaron. Este procedimiento se realizó con plantas inoculadas en suelo con la cepa UY031 (7 dpi) y plantas inoculadas con suero fisiológico estéril.

4.3.4 Extracción de savia xilemática (SX).

Para la extracción de savia xilemática, las plantas fueron trasplantadas a macetas con 1 kg de sustrato hortícola y mantenidas en invernadero durante 3-4 semanas para continuar su crecimiento. Posteriormente, las plantas fueron trasplantadas a bolsas-macetas con 5 kg de sustrato hortícola y se dejaron crecer durante 3-4 semanas adicionales.

El día previo a la colecta de SX las plantas se regaron para crear un potencial hídrico del suelo menos negativo y favorecer así la captación de agua desde las raíces. Para obtener la SX, los tallos de las plantas fueron cortados 5 cm y sobre el nivel del suelo, se lavaron los extremos cortados con agua destilada y se secaron con papel absorbente. Posteriormente se colocó un tubo tipo Falcon de 50 ml donde se colectó la SX, sellando la boca de cada tubo con *parafilm* para evitar la contaminación y el secado de la muestra. Las macetas fueron invertidas levemente para favorecer la exudación y se colectó la SX exudada por presión de las raíces a través del extremo cortado durante 24 h (Figura 4.1). Para cada genotipo se juntaron las muestras obtenidas a partir de 20-25 plantas, las cuales se esterilizaron mediante filtración por membrana de 0,22 µm y se almacenaron a -20°C.

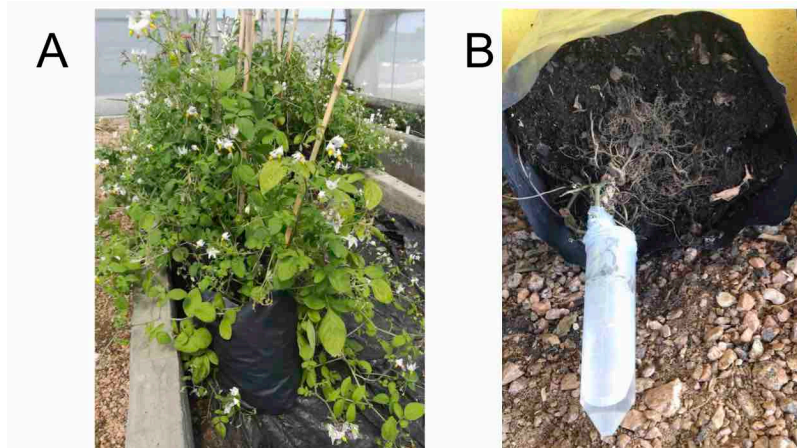


Figura 4.1. Colecta de savia xilemática (SX) a partir de plantas de los genotipos seleccionados. **A:** Plantas dispuestas en bolsas-macetas de 5 kg previo a la extracción de SX. **B:** Recolección de SX mediante exudación del tallo por presión de las raíces.

4.3.5 Cuantificación del ionoma.

El perfil y concentración de minerales presentes en SX, raíces, tallos y hojas de los genotipos seleccionados fue analizado mediante espectroscopia de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) (Perkin Elmer, 7100 DV), midiendo simultáneamente la concentración de Ag, B, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, S, y Zn. También se analizaron los minerales en medio rico (CPG) y medio mínimo (MM). Para el análisis de la SX, CPG y MM se colocaron 200 μ l de cada muestra en tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml limpios y secos y se mezclaron homogéneamente con 800 μ l de agua ultra pura libre de metales. Se analizaron blancos de agua ultra pura libre de metales en paralelo.

Las muestras de hojas, tallos y raíces fueron transferidas a tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml limpios y secos y el peso se ajustó a 10 mg. Luego se agregaron 200 μ l de ácido nítrico concentrado y se realizó un orificio en el centro de la tapa del tubo para expulsar los vapores durante la posterior digestión y así evitar que se abran los tubos. Los tubos fueron colocados en un termobloque a 99°C durante 30 min – 1 h para la digestión de las muestras sólidas. Luego de la digestión, se agregaron 800 μ l de agua ultra pura libre de metales y se mezcló bien cada muestra. Para evitar la obstrucción del equipo las muestras se centrifugaron a 13000 rpm durante 7 min y los sobrenadantes se transfirieron a tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml limpios y secos. Se analizaron blancos de ácido nítrico concentrado con agua ultra pura libre de metales. La concentración de los minerales se obtuvo a partir de una curva de calibración creada con estándares certificados de los distintos minerales (SPEX Certiprep). La concentración de fósforo fue

utilizada para normalizar la concentración de los demás minerales porque los tejidos de la planta no se secaron homogéneamente y por lo tanto el peso seco no pudo ser utilizado para la normalización.

4.3.6 Curvas de crecimiento.

Las curvas de crecimiento se realizaron con las cepas GMI1000 y UY031 en medio CPG, MM y SX obtenida de los genotipos seleccionados. Para analizar el efecto del calcio sobre el crecimiento de la bacteria se agregó al medio CaCl_2 en una concentración final de 1,0 mM. Ambas cepas se cultivaron durante dos días en placas de medio Phi con TTC (Kelman, 1954), a partir de las colonias obtenidas se realizaron suspensiones en *buffer* fosfato salino (PBS) y la OD_{600} se ajustó a 0,1. Luego de preparadas las suspensiones se colocaron 190 μl del medio correspondiente en cada pocillo de placas de microtitulación de poliestireno (Deltalab) y se agregaron 10 μl de la suspensión bacteriana. Las placas fueron incubadas a 28°C con agitación y el crecimiento fue estimado mediante la medida de OD_{600} durante 66 h, 85 h y 8 días en CPG, MM y SX respectivamente. Las medidas fueron tomadas en espectrofotómetro (Tecan, Infinite® 200 PRO) cada 1 h para las curvas de crecimiento en CPG y MM y cada 1 día en espectrofotómetro (Biotek, Citation 3) para las curvas con SX. Por cada tratamiento se incluyeron 16 réplicas y los blancos fueron realizados con el medio de cultivo sin inocular.

4.3.7 Cuantificación de *biofilm* en placas de microtitulación.

La formación de *biofilm* fue evaluada en las cepas GMI1000 y UY031 en medio CPG, MM y SX. Para analizar el efecto del calcio sobre la formación de *biofilm*, se agregó CaCl_2 en concentraciones finales de 0,7 mM o 1,0 mM dependiendo del experimento realizado. Las suspensiones bacterianas se prepararon como fue descrito en el apartado 4.3.6. Se colocaron 190 μl del medio en cada pocillo de la placa de microtitulación y luego se agregaron 10 μl de la suspensión bacteriana. Las placas fueron incubadas a 28°C sin agitación durante 24 h. Luego de la incubación, el crecimiento planctónico fue cuantificado transfiriendo el sobrenadante de cada pocillo, que contiene células en suspensión, a una placa nueva y se estimó midiendo la OD_{600} en espectrofotómetro (Biotek, Citation 3). Para cuantificar la formación de *biofilm*, la placa original donde se incubaron las células fue lavada 1 vez con 230 μl de agua Milli-Q, teñida con 230 μl de cristal violeta 0,1% durante 20 min y luego lavada nuevamente con 230 μl de agua Milli-Q.

Finalmente se agregaron 230 μ l de etanol 95%, la placa se colocó en agitador durante 5 min y se estimó la formación de *biofilm* midiendo la OD₅₉₀ en espectrofotómetro (Biotek, Citation 3). Cada experimento se repitió al menos dos veces incluyendo en cada oportunidad 6-8 réplicas por condición, así como blancos con el medio de cultivo sin inocular.

4.3.8 Análisis de la formación de *biofilm* mediante microscopía confocal de fluorescencia.

Para analizar la formación de *biofilm in vitro* se evaluaron las estructuras formadas por las cepas GMI1000 Pps-GFP y UY031 Pps-GFP en cámaras de crecimiento celular de 8 pocillos para microscopía (Sigma Aldrich, Nunc® Labtek® Chamber Slide system). Las suspensiones bacterianas se prepararon a partir de cultivos crecidos durante la noche en medio CPG y la OD₆₀₀ se ajustó a 0,1. Para analizar el efecto del calcio sobre la formación de *biofilm*, se agregó CaCl₂ al medio en una concentración final de 1,0 mM. Se realizaron diluciones 1:20 en CPG, 300 μ l fueron colocados en cada pocillo de la cámara de crecimiento y las placas fueron incubadas a 28°C sin agitación durante 3 días. La formación de *biofilm* fue visualizada cada día usando microscopio confocal (Leica, TCS-SP₅). Cada tratamiento incluyó 3 réplicas y los blancos fueron realizados con el medio de cultivo sin inocular.

4.3.9 Análisis de la movilidad tipo *twitching*.

Los experimentos para evaluar la movilidad tipo *twitching* se realizaron con las cepas GMI1000 y UY031 en placas de CPG y CPG suplementado con CaCl₂ en una concentración final de 1,0 mM. Se prepararon suspensiones bacterianas como fue descrito anteriormente y la concentración se ajustó a 10⁵ ufc/ml. Posteriormente, se sembraron 10 μ l de la suspensión bacteriana por cuadruplicado en cada placa de CPG y se incubaron a 28°C durante 2 días. Luego de la incubación se evaluó la morfología del borde de las colonias con microscopio óptico (Nikon, Eclipse E200). Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado con un total de 16 evaluaciones por condición.

4.3.10 Incubación de *R. solanacearum* en cámaras de microfluído (CM).

Se optimizaron las condiciones para el crecimiento de *R. solanacearum* bajo condiciones de flujo utilizando CM. Este trabajo se realizó en el Departamento de Entomología y Patología de Plantas de la Universidad de Auburn (Alabama, Estados Unidos), en el marco de una colaboración con el Dr. Leonardo De La Fuente.

4.3.10.1 Construcción y armado de las cámaras.

Para obtener cámaras de microfluído (CM) es necesario previamente construir un molde mediante un proceso delicado con numerosas etapas (Meng et al., 2005). Brevemente, sobre una lámina de silicio (*wafer*) resistente a la radiación UV, se coloca una fina capa del polímero fotosensible SU8-2050 (Easley's lab, Micro Chem), éste tiene como característica que las zonas expuestas a la luz UV se vuelven insolubles a la solución de lavado. Sobre éste se coloca una fotomáscara con el diseño de interés, se irradia con luz UV (405nm, fotolitografía) y se aplica plasma quimioreactivo que reacciona con la superficie del *wafer* produciendo el grabado. Luego se realiza un lavado para remover SU8-2050 fuera de las zonas expuestas, para obtener finalmente el molde (Figura 4.2). Después de obtenido el molde éste puede ser utilizado reiteradas veces para la construcción de CM.

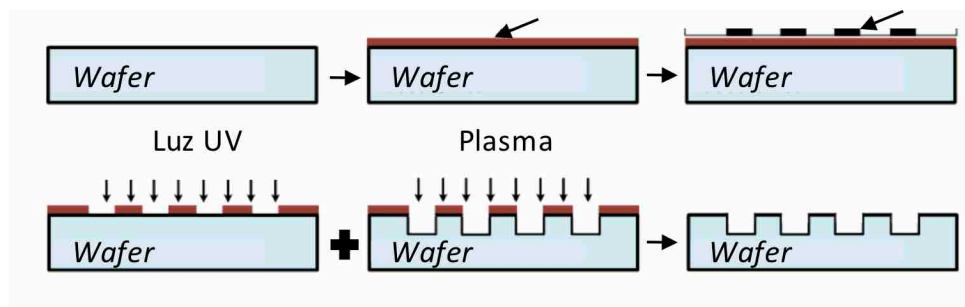


Figura 4.2. Esquema de construcción del molde para cámaras de microfluído (*wafer*) mediante fotolitografía y grabado con especies reactivas, adaptado de Li et al, 2018.

Al igual que para obtener el molde, el proceso para construir las CM es sumamente delicado y con numerosas etapas (Meng et al., 2005; De La Fuente et al., 2007). Brevemente, para generar los canales de la CM se utiliza el polímero polidimetilsiloxano (PDMS) como soporte, éste debe verterse en el molde y luego pasar por una etapa de vacío para extraer todas las burbujas. Posteriormente el polímero se

comprime y solidifica, finalizadas estas etapas se debe recortar y despegar cuidadosamente del molde para obtener los canales que darán lugar a las CM (Figura 4.3).

Finalmente debe adherirse el soporte de PDMS a una lámina de vidrio (cubreobjetos) para cubrir los canales generados en el molde y así formar la cámara. Para asegurar la unión de ambos materiales éstos se tratan previamente con plasma de aire para activar las superficies y facilitar la formación de enlaces covalentes entre ellos. Posteriormente se colocan tubos de silicona como conexiones para agregar los distintos fluidos y coleccionar los desechos a través de jeringas, además de otra lámina de vidrio como soporte y PDMS para cubrir todas las uniones y asegurar que no existan fugas (Figura 4.4-A y B). Todo el sistema se esteriliza antes de usar.

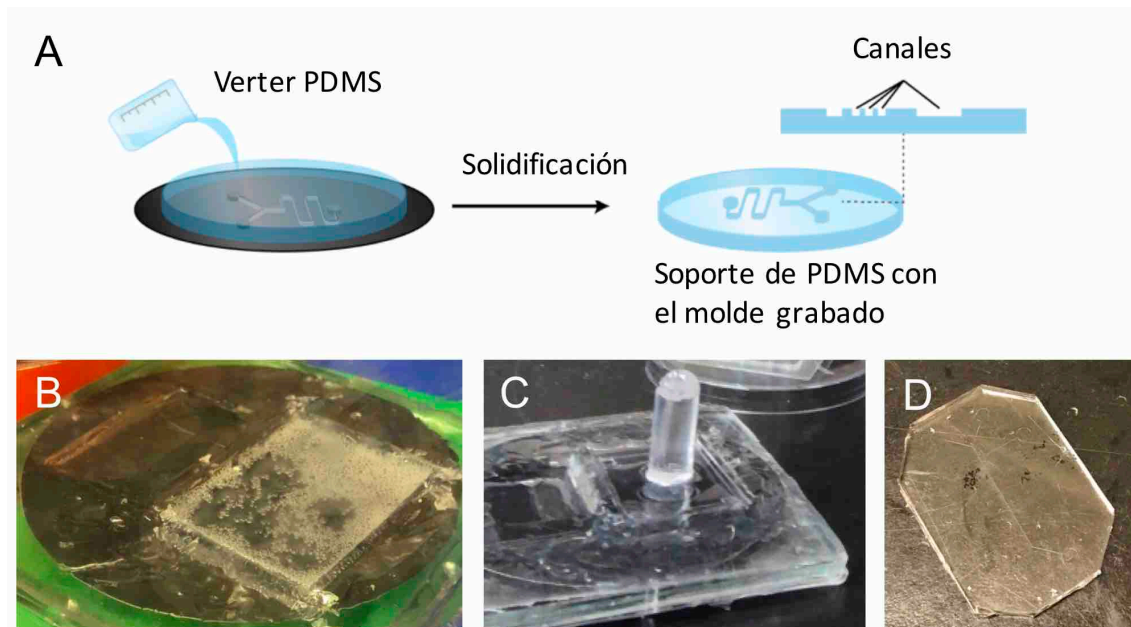


Figura 4.3. Proceso de construcción de cámaras de microfluído (CM). **A:** Esquema para la generación de los canales para CM (adaptado de CMBL, 2019). **B:** Etapa de vacío para extracción de burbujas luego de vertido el PDMS en el molde. **C:** Etapa de compresión y solidificación. **D:** Soporte de PDMS recortado y extraído del molde con los canales grabados.

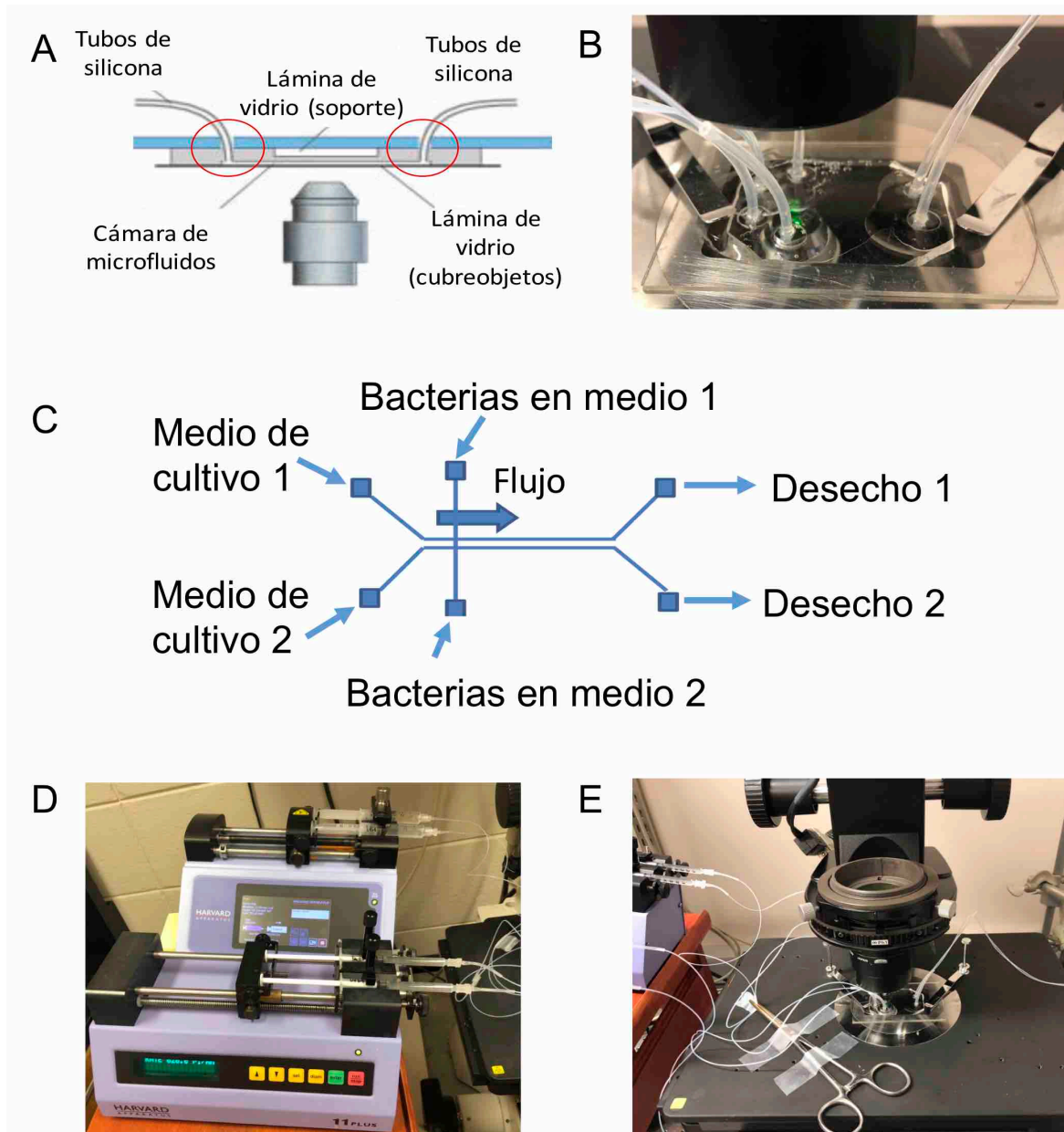


Figura 4.4. Cámara de microfluído (CM) finalizada y esquema de funcionamiento. **A:** Esquema de la CM armada, adaptado de Meng et al., 2005. **B:** CM finalizada utilizada en este trabajo. **C:** Esquema de los canales usados en CM y su funcionamiento. **D:** Inyectores automáticos para jeringas utilizados para ingresar medio de cultivo y suspensiones bacterianas a las CM. **E:** CM con sus conexiones en funcionamiento utilizada en este trabajo.

4.3.10.2 Funcionamiento y parámetros críticos.

En este trabajo se utilizaron CM con un diseño de dos canales independientes en paralelo, cada uno tiene 80 μm de ancho, 4.7 cm de largo y 50 μm de profundidad. Para introducir los distintos medios a evaluar y los cultivos celulares, son necesarios inyectores automáticos que regulan la velocidad de flujo a través de

jeringas (Figura 4.4-C, D y E). Este parámetro es necesario optimizarlo para cada microorganismo en estudio.

Al comienzo de cada experimento debe introducirse el medio de cultivo estéril y luego el cultivo celular. En esta etapa la velocidad de flujo utilizada es de 100-1000 veces mayor a la velocidad final dado que el objetivo es asegurarse que los canales se llenen con el medio inoculado y también eliminar todas las burbujas de aire. Esta etapa toma como mínimo 1 hora y puede extenderse por varias horas dependiendo de cuanto aire se encuentre en los canales. La velocidad de flujo del medio y el cultivo celular deben ser similares para que las células puedan ingresar al canal principal y para que la dirección del flujo sea hacia el desecho. Para hacer el seguimiento en esta primera etapa y posteriormente continuar con el experimento es necesario tener un microscopio acoplado, en este trabajo se utilizó un microscopio óptico de fluorescencia (Nikon, Eclipse Ti-U).

4.3.10.3 Optimización de condiciones para el cultivo de *R. solanacearum*.

Hasta el momento el crecimiento de esta bacteria fitopatógena no ha sido evaluada bajo condiciones de flujo en CM, por lo cual fue necesario optimizar el procedimiento teniendo en cuenta antecedentes de otras bacterias fitopatógenas vasculares en las que se tiene experiencia en el laboratorio donde se realizaron los experimentos (*Xylella fastidiosa* y *Liberibacter crescens*). Al comienzo de cada experimento es necesario obtener una cantidad considerable de células adheridas a la CM. Posteriormente se detiene el flujo celular, dejando pasar únicamente medio estéril por el canal principal y se espera que las células adheridas se multipliquen dando lugar a determinado fenotipo dependiendo del medio de cultivo y el microorganismo que se esté evaluando. Los dos parámetros críticos que se establecen antes de comenzar un experimento son la concentración bacteriana inicial y la velocidad de flujo. En el caso de *X. fastidiosa* la OD₆₀₀ se ajustó rutinariamente a 0,6 y la velocidad de flujo utilizada fue 250 nI/min. Dado que *R. solanacearum* es una bacteria de crecimiento más rápido, la optimización se realizó probando OD₆₀₀ menores para la suspensión bacteriana inicial y también velocidades de flujo menores a las utilizadas en *X. fastidiosa*. El tiempo en el cual deben evaluarse las distintas actividades también fue necesario optimizarlo ya que este parámetro es dependiente del sistema en estudio. En las primeras pruebas de cada condición a evaluar se realizó un seguimiento del crecimiento y se dejó la cámara de microfluído funcionando por varios días hasta lograr su estabilización.

4.3.10.4 Seguimiento del crecimiento de *R. solanacearum*.

Los experimentos se realizaron con la cepa GMI1000 en CPG, MM y SX. Para analizar el efecto del calcio sobre el crecimiento de la bacteria bajo condiciones de flujo, se agregó CaCl_2 en una concentración final de 1,0 mM. En una primera etapa los canales se llenaron con medio de cultivo utilizando una jeringa impulsada por inyectores automáticos (Harvard Apparatus, Pico Plus) y la velocidad de flujo fue mantenida en 100 nl/min. La suspensión bacteriana inicial se preparó en el medio de cultivo correspondiente, se ajustó la OD_{600} a 0,5 y posteriormente se inyectó con jeringa impulsada por inyectores automáticos (Harvard Apparatus, Pico Plus) para obtener células adheridas. Cuando la concentración de células adheridas fue mayor a 10 células/100 μm^2 , se restringió la entrada de bacteria y la CM se monitoreó durante 3-4 días a temperatura ambiente. Para ello, se montó la CM en un microscopio invertido (Nikon, Eclipse Ti-U) y se observó con objetivo 40X usando contraste de fase y contraste de interferencia diferencial Nomarski (DIC). El seguimiento de la bacteria en la CM se realizó mediante microscopía *time-lapse*, las secuencias de imágenes tomadas a lo largo del tiempo se grabaron y luego se visualizaron como un video. Las imágenes fueron tomadas automáticamente cada 30 segundos con cámara digital (Nikon, DS-Q1) controlada por *software* (NIS-Elements 3.0, Nikon). Cada tratamiento se realizó como mínimo por triplicado.

4.3.11 Análisis del efecto del calcio sobre la marchitez bacteriana.

Para evaluar el efecto del agregado exógeno de calcio sobre la resistencia a la marchitez bacteriana, plantas del control susceptible cv. Chieftain y del genotipo parcialmente resistente 09509.6 crecidas durante 2 meses se regaron periódicamente con 40 ml de suero fisiológico suplementado con CaCl_2 20 mM (Yamazaki and Hoshina 1995; Yamazaki et al., 1999). Las plantas fueron mantenidas en fitotrón a 24/20°C día/noche con 65% de humedad y un fotoperíodo de 16 h luz/8 h de oscuridad. Luego de 12 días de tratamiento con calcio la sexta hoja de cada planta fue extraída y procesada como fue descrito en el apartado 4.3.5 para ser analizada por ICP-OES. Al día siguiente, las plantas fueron inoculadas en suelo con una suspensión de la cepa GMI1000 siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 4.3.2. Posteriormente a la inoculación la temperatura en el fitotrón fue elevada a 28/20°C día/noche con 65% de humedad y un fotoperíodo de 16 h luz/8 h de oscuridad. El progreso de la enfermedad fue visualizado

durante 28 días siguiendo la escala de 0 (planta asintomática) a 4 (planta muerta, todas las hojas marchitas). Al final del experimento se integraron los datos y se calculó la resistencia de cada genotipo/tratamiento en base al cálculo del área bajo la curva de evolución de la enfermedad (AUDPC). Luego de 15 días de inoculadas las plantas, se tomó nuevamente una muestra de hoja de cada planta las cuales se analizaron por ICP-OES, en este caso la séptima hoja fue extraída. Las plantas inoculadas con suero fisiológico fueron consideradas como controles negativos. Se utilizaron 6 réplicas por cada tratamiento.

4.3.12 Análisis de datos.

El análisis del efecto del calcio sobre los diferentes aspectos evaluados se realizó mediante aplicación de la prueba *t* de Student con un 95% o un 99% de nivel de confianza. El análisis comparativo de los perfiles minerales y de AUDPC se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA), utilizando el índice de Tukey con un 95% de confianza para la comparación de medias. El modelo residual fue usado para chequear que las varianzas analizadas fueran homogéneas y tuvieran una distribución normal. El análisis estadístico fue realizado utilizando el programa Infostat (Di Rienzo et al., 2009).

4.4 - RESULTADOS

4.4 Resultados.

4.4.1 Análisis del ionoma en plantas de papa con diferentes niveles de resistencia a *R. solanacearum*.

Los patógenos vasculares como *R. solanacearum* están específicamente adaptados para prosperar dentro de los vasos de xilema, causando el marchitamiento de la planta hospedera. En este estudio se compararon los perfiles de minerales en SX, tallo, hoja y raíces de diferentes genotipos, con el objetivo de analizar una posible relación del ionoma con la resistencia a este patógeno.

Los elementos minerales más abundantes en la SX de ambos genotipos evaluados fueron K, P, S, Mg y Ca, con concentraciones entre 0,6-1,7 mM. Para todos estos minerales las concentraciones detectadas en el genotipo resistente 09509.6 fueron significativamente mayores a las del genotipo susceptible 13001.79 ($P < 0.05$) (Tabla 4.1, Figura 4.5). Ag, B, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Na, Ni y Zn no fueron detectados ($< 0,02$ mM).

A partir de estos resultados surgió la idea de evaluar cómo la concentración de estos minerales puede afectar el crecimiento, la formación de *biofilm*, adhesión y movilidad de *R. solanacearum*. Para ello, en una primera etapa se cuantificó la composición de estos minerales en los medios de cultivo CPG y MM, de forma de evaluar si es posible suplementar estos medios con algunos de estos minerales para alcanzar concentraciones similares a las encontradas en las muestras de SX (Tabla 4.1). Como resultado, se encontró que las concentraciones de K, P y S fueron sensiblemente mayores en ambos medios de cultivo respecto a las concentraciones en SX, por lo que se seleccionaron Ca y Mg como posibles candidatos para continuar con los experimentos y así poder suplementar los medios con estos elementos.

Tabla 4.1 Concentración de minerales presentes en la savia xilemática (SX) de genotipos de papa con diferentes niveles de resistencia a marchitez bacteriana (13001.79: susceptible; 09509.6: parcialmente resistente). También se detalla la concentración de estos minerales en medio rico (CPG) y medio mínimo (MM).

Mineral ^a	Concentración (mM)			
	13001.79	09509.6	CPG	MM
Ca	0,68 ± 0,02	1,01 ± 0,01	ND ^b	ND ^b
K	0,87 ± 0,20	1,60 ± 0,46	3,23 ± 0,03	42,39 ± 0,29
Mg	0,59 ± 0,03	1,06 ± 0,13	ND ^b	0,24 ± 0,01
P	0,72 ± 0,10	1,69 ± 0,35	2,79 ± 0,02	42,83 ± 0,23
S	0,95 ± 0,02	1,20 ± 0,14	2,64 ± 0,02	4,54 ± 0,04

^a Ag, B, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Na, Ni, Zn no fueron detectados. ^bND: no detectado (<0,02 mM).

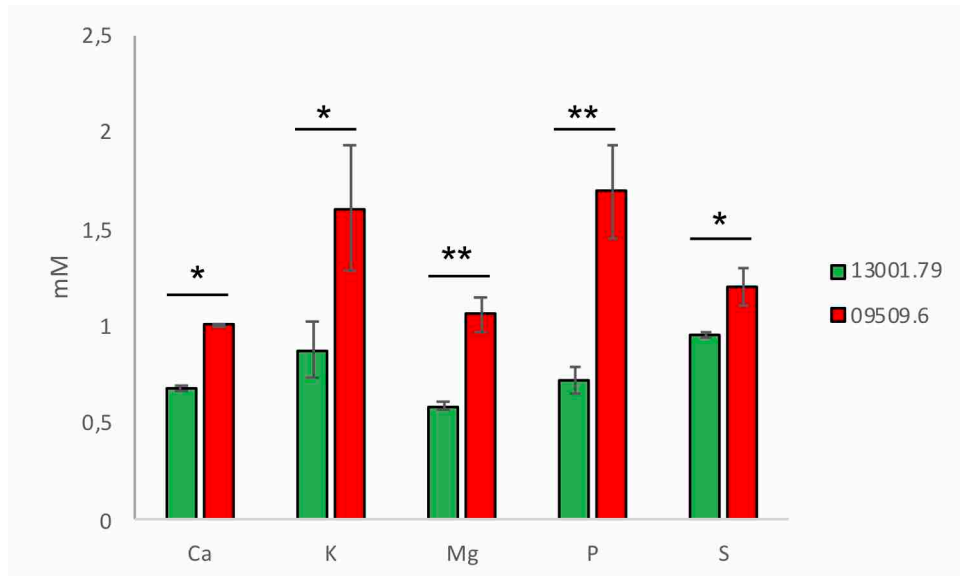


Figura 4.5. Perfil iónico de la savia xilemática (SX) extraída de genotipos de papa con diferentes niveles de resistencia a *Ralstonia solanacearum* (13001.79: susceptible; 09509.6: parcialmente resistente). Se muestran las concentraciones promedio (n=2) de los minerales más concentrados. Las barras verticales representan el error estándar. (*): diferencias significativas, $P < 0.05$. (**): diferencias significativas, $P < 0.01$.

En una segunda etapa, se comparó el perfil ionómico en muestras de hoja, tallo y raíz de los genotipos 13001.79, 09509.6 y cv. Chieftain. En este caso, se realizaron evaluaciones sobre plantas no inoculadas y plantas inoculadas con *R. solanacearum*, con el objetivo de evaluar si la infección con el patógeno tiene algún efecto sobre la concentración de alguno de los minerales presentes.

Se midió simultáneamente la concentración de Ag, B, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, S, y Zn y se utilizó la concentración de P para normalizar la concentración de los demás minerales dado que las muestras no se secaron homogéneamente y no se pudo utilizar el peso seco para la normalización. Anteriormente se había observado que la concentración de P es proporcional al peso seco del tejido.

En todas las condiciones y tejidos analizados, los minerales más concentrados fueron K, Ca, Mg y S. Ag, B, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Na, Ni y Zn no fueron detectados (<0,02 mM) en ninguna de las muestras analizadas (Tabla 4.2). En general se observó un aumento de la concentración de la mayoría de los minerales en los tejidos de las plantas infectadas respecto a las plantas sin inocular, sin embargo, estas diferencias no resultaron significativas (Figura 4.6).

Cuando se compararon los iones de los distintos genotipos, se encontró que la concentración de Ca del genotipo parcialmente resistente 09509.6 a nivel de tallo, es significativamente mayor que la concentración de este mineral en los genotipos susceptibles ($P=0.0007$). Este resultado es concordante con lo observado en SX, donde la concentración de Ca del genotipo 09509.6 también es mayor que la detectada en el genotipo susceptible 13001.79 ($P=0.0011$). En la Figura 4.7 se pueden observar los resultados de la concentración de Ca en las diferentes muestras evaluadas. Dado que la bacteria se localiza y prolifera en el tallo de la planta en contacto con la SX, se decidió continuar evaluando el efecto de este mineral sobre el crecimiento y la virulencia del patógeno.

Tabla 4.2 Concentración de minerales presentes en hoja, tallo y raíces de genotipos de papa con diferentes niveles de resistencia a *Ralstonia solanacearum* (Chieftain: cv susceptible; 13001.79: susceptible; 09509.6: parcialmente resistente), en plantas sin inocular (NI) y plantas analizadas luego de 7 días posteriores a la inoculación con el patógeno (I).

Mineral ^a	Concentración (µg/µg de P)																	
	Hoja						Tallo						Raíz					
	Chieftain		13001.79		09509.6		Chieftain		13001.79		09509.6		Chieftain		13001.79		09509.6	
	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I
Ca	0,93 ±	0,93 ±	0,94 ±	1,50 ±	0,89 ±	1,51 ±	0,57 ±	0,77 ±	0,46 ±	0,53 ±	1,45 ±	1,58 ±	0,20±	0,31 ±	0,19 ±	0,16 ±	0,26 ±	0,34 ±
	0,04	0,11	0,05	0,31	0,20	0,45	0,06	0,06	0,03	0,11	0,11	0,11	0,12	0,01	0,126	0,01	0,25	0,02
K	3,32 ±	3,75 ±	3,09 ±	3,81 ±	3,23 ±	4,75 ±	2,97 ±	5,16 ±	5,85 ±	6,51 ±	5,74 ±	7,44±	1,74 ±	1,96 ±	2,33 ±	2,19±	2,56 ±	2,49 ±
	0,06	0,38	0,36	0,67	0,13	0,68	0,64	0,20	0,40	1,28	0,82	0,92	0,16	0,04	0,05	0,09	0,09	0,02
Mg	0,49 ±	0,46 ±	0,51 ±	0,64 ±	0,54 ±	0,86 ±	0,63 ±	0,59 ±	0,64 ±	0,61±	0,76 ±	0,75 ±	0,34 ±	0,36 ±	0,27 ±	0,24 ±	0,34 ±	0,34 ±
	0,01	0,03	0,02	0,12	0,09	0,25	0,02	0,06	0,03	0,09	0,06	0,09	0,02	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02
S	0,08 ±	0,12 ±	0,22 ±	0,35 ±	0,13 ±	0,40±	0,08 ±	0,09 ±	0,08 ±	0,11 ±	0,11 ±	0,15 ±	0,08 ±	0,13 ±	0,10±	0,17 ±	0,11 ±	0,15 ±
	0,01	0,01	0,01	0,05	0,01	0,12	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01

^a Ag, B, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Na, Ni, Zn no fueron detectados (<0,02 mM).

Resultados

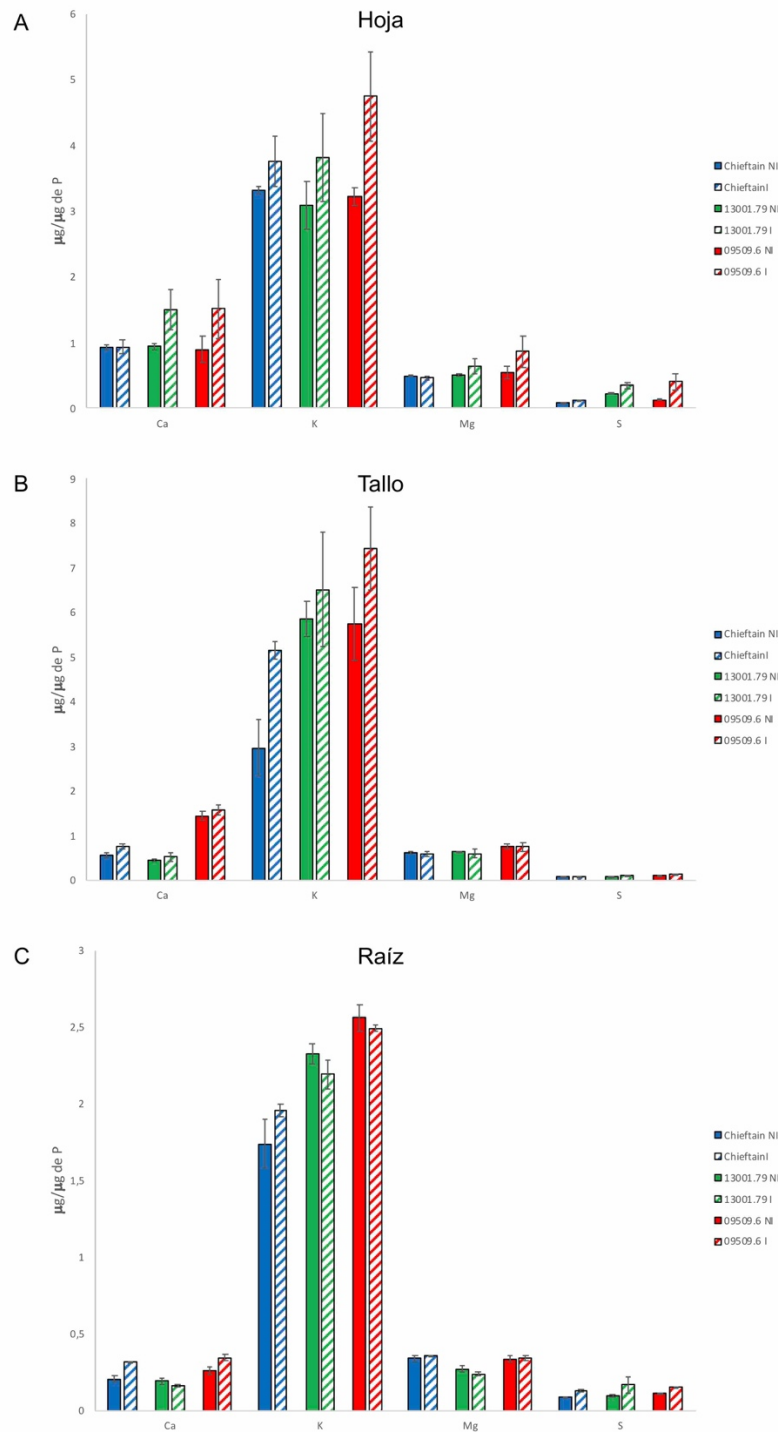


Figura 4.6. Perfil ionómico de hoja (A), tallo (B) y raíces (C) en genotipos de papa con diferentes niveles de resistencia a *Ralstonia solanacearum* (Chieftain: cv. susceptible; 13001.79: susceptible; 09509.6: parcialmente resistente). Se muestran las concentraciones promedio (n=3) de los minerales más concentrados en plantas sin inocular (NI, columnas lisas) e inoculadas con *R. solanacearum* (I, columnas rayadas). Las barras verticales representan el error estándar.

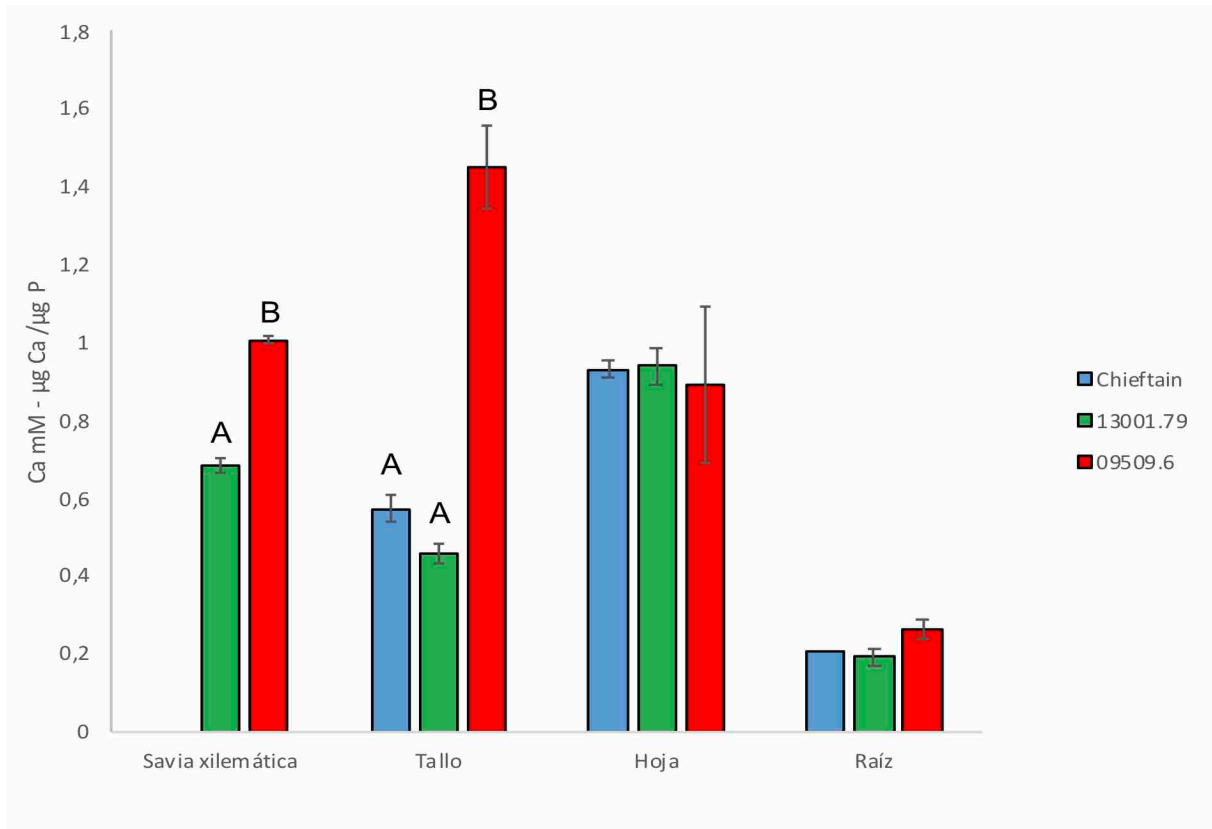


Figura 4.7. Cuantificación de calcio en savia xilemática (SX), tallo, hoja y raíz en genotipos de papa con diferentes niveles de resistencia a *Ralstonia solanacearum* (Chieftain: cv. susceptible; 13001.79: susceptible; 09509.6: parcialmente resistente). Las concentraciones de Ca se indican en mM para las muestras de SX y en $\mu\text{g Ca}/\mu\text{g P}$ para las muestras de tallo, hoja y raíz. Las barras verticales representan el error estándar. Se indican con letras diferentes las diferencias significativas entre los niveles de Ca de diferentes genotipos para cada tipo de muestra en base al índice de Tukey ($P < 0,05$).

4.4.2 Efecto del calcio en el crecimiento de *R. solanacearum*.

Se realizaron curvas de crecimiento en CPG y MM suplementados con CaCl_2 1,0 mM en placas de microtitulación con agitación utilizando la cepa GMI1000 y UY031 (Figura 4.8). La concentración de Ca seleccionada para suplementar los medios fue 1,0 mM, similar a la concentración encontrada en la SX del genotipo resistente. Como resultado se observó que el Ca no generó ningún efecto en el crecimiento de *R. solanacearum* en medio CPG para ninguna de las cepas evaluadas (Figura 4.8-A). Sin embargo, cuando el crecimiento fue evaluado en MM suplementado con Ca, se observó una disminución significativa en el crecimiento de ambas cepas respecto al MM sin suplementar (Figura 4.8-B).

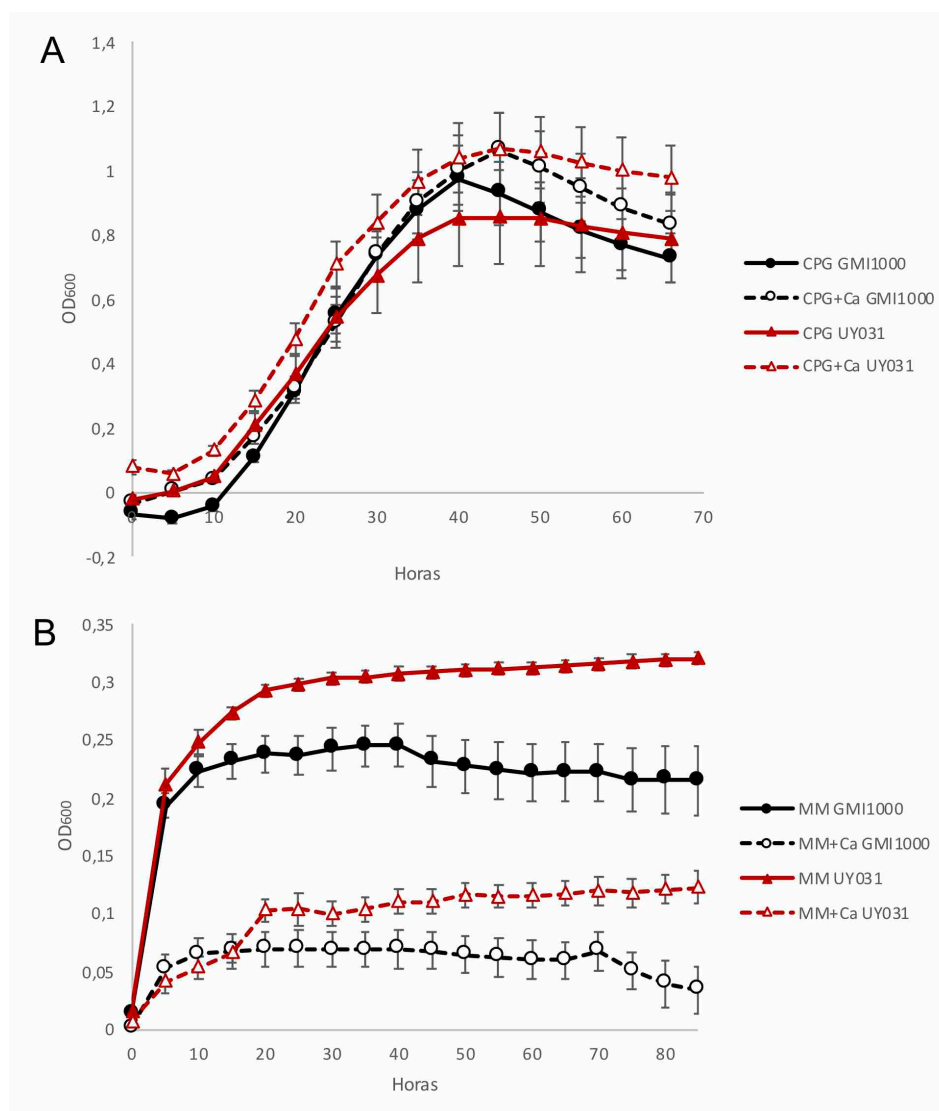


Figura 4.8. Curvas de crecimiento de *Ralstonia solanacearum* UY031 y *Ralstonia pseudosolanacearum* GMI1000 en medio rico CPG (A) y medio mínimo MM (B) con y sin suplementación con CaCl₂ en concentración 1,0 mM. Cada punto representa el promedio de OD₆₀₀ de cada tratamiento (n=16). Las barras verticales representan el error estándar.

4.4.3 Efecto del calcio en la formación de *biofilm*.

En una primera instancia, se evaluó la capacidad del patógeno de formar *biofilm* en ensayos en placa de microtitulación utilizando como medio de crecimiento muestras de SX de genotipos con diferentes niveles de resistencia a marchitez bacteriana. Este primer ensayo se realizó con la cepa GMI1000 incluyendo también evaluaciones en medio rico (CPG) y medio mínimo (MM). La formación de *biofilm* se evaluó a las 24 h siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.3.7. Como resultado se pudo verificar la producción de *biofilm* de forma confiable y reproducible únicamente cuando el ensayo se fue realizado en

medio rico CPG. Por otro lado, tanto en MM como en las muestras de SX, la producción de *biofilm* fue muy baja y se obtuvo una muy alta variabilidad entre réplicas (Figura 4.9). Este experimento se repitió cinco veces y el resultado fue similar en todos los casos. En el caso del MM se ensayaron otras variantes, incluyendo la evaluación a tiempos de incubación más largos (48 y 72 h) y la suplementación con diferentes compuestos como fuente de carbono y energía (glucosa 0,2%; glucosa 0,2% más glicerol 2%; ácido glutámico 10 mM y sacarosa 10 mM) (Khokhani et al., 2017; Monteiro et al., 2012b). Como resultado, ninguna de las variaciones antes mencionadas, mejoró el crecimiento de la bacteria y la variabilidad de los resultados.

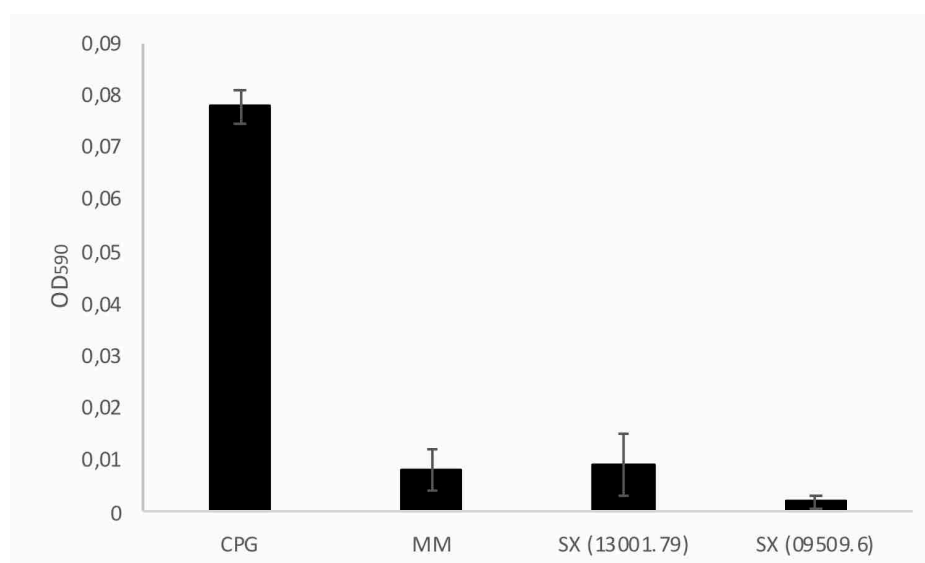


Figura 4.9. Cuantificación de *biofilm* de *Ralstonia pseudosolanacearum* GMI1000 mediante ensayo en placa de microtitulación con muestras de savia xilemática (SX) de genotipos con diferentes niveles de resistencia a marchitez bacteriana. Los resultados se compararon con la formación de *biofilm* en medio rico (CPG) y medio mínimo (MM). Cada columna representa el promedio de las OD₅₉₀ (n=6). Las barras verticales representan el error estándar.

En base a estos resultados, se continuó utilizando el medio rico CPG para evaluar el efecto del Ca sobre la capacidad de formación de *biofilm*. Para ello, se evaluó la suplementación con dos concentraciones finales de Ca diferentes (0,7 y 1,0 mM), encontrando en ambos casos una reducción significativa ($P=0,003$) en la capacidad de formación de *biofilm* respecto al medio sin suplementar (Figura 4.10-A). Por otro lado, este efecto sólo se pudo verificar para la cepa GMI1000. La cepa UY031 mostró una menor capacidad de formación de *biofilm* que la cepa GMI1000 y la misma no varió por la suplementación con Ca al medio (Figura 4.10-B).

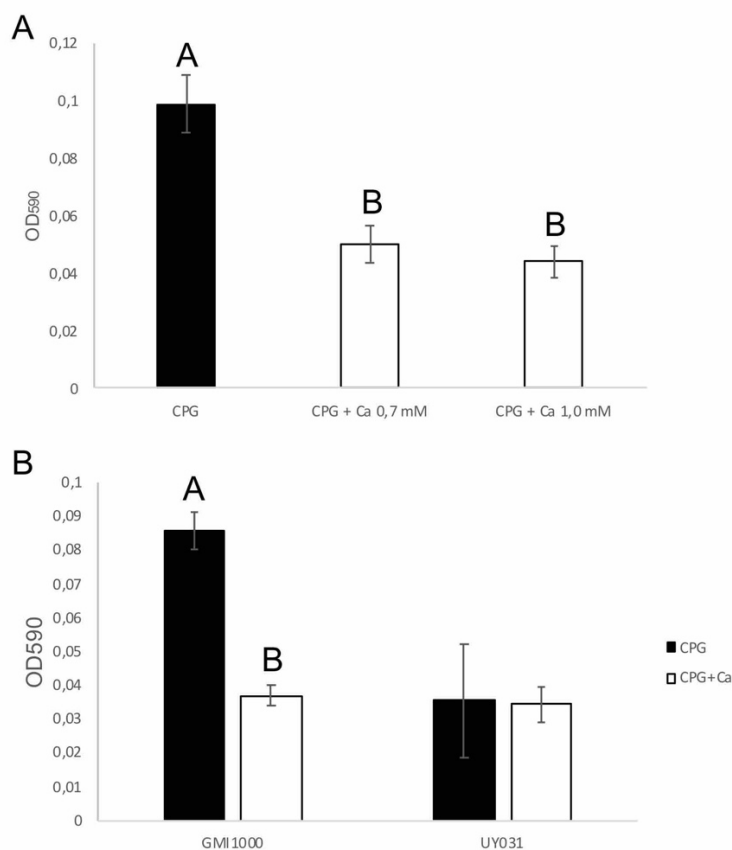


Figura 4.10. Evaluación del efecto del calcio en la formación de *biofilm* en medio rico CPG mediante ensayo en placa de microtitulación. **A:** Cuantificación del *biofilm* formado por la cepa de *Ralstonia pseudosolanacearum* (GMI1000) en medio CPG y medio CPG suplementado con CaCl_2 a concentraciones finales de 0,7 y 1,0 mM. **B:** Cuantificación del *biofilm* formado por la cepa de *R. pseudosolanacearum* (GMI1000) y *R. solanacearum* (UY031) en medio rico CPG y medio CPG suplementado con CaCl_2 a una concentración final de 1,0 mM. Cada columna representa el promedio de las OD590 (n=8). Las barras verticales representan el error estándar. Se indican con letras diferentes las diferencias significativas entre los valores de *biofilm* para cada condición ($P < 0.05$).

La evaluación del efecto del calcio sobre la formación de *biofilm* también se realizó mediante observación por microscopía confocal de fluorescencia utilizando las cepas reporteras GMI1000 Pps-GFP y UY031 Pps-GFP. Para la cepa GMI1000 Pps-GFP creciendo en medio CPG se observó claramente un aumento continuo en la formación de agrupaciones de células compactadas a lo largo de los tres días en los que se realizaron las evaluaciones. En el medio CPG suplementado con calcio se observó también este efecto, pero con un menor número de células formando estructuras menos densas (Figura 4.11-A). Para la cepa UY031 Pps-GFP los resultados no fueron tan claros ya que a lo largo de los días no se vieron diferencias evidentes entre los tratamientos. El tercer día de incubación parece haber mayor formación de *biofilm* en

el medio rico sin suplementar, pero como se puede observar en la figura 4.11-B, hay muchas zonas donde se observaron acúmulos celulares que no permiten evaluar con mayor definición la formación de *biofilm*. Estos experimentos fueron anteriormente optimizados para poder observar el *biofilm* en los días adecuados, dado que el tiempo del ensayo depende del crecimiento de la bacteria en las cámaras de crecimiento utilizadas. En la optimización se observó que a partir del día 3-4 de incubación se comienzan a formar acúmulos celulares y esto imposibilita la observación de la formación del entramado del *biofilm*. Además, se probó hacer el mismo experimento, pero en MM, en este caso el seguimiento se realizó durante 7 días. No se observó formación de *biofilm* en las cámaras de crecimiento al igual que en el método en placas de microtitulación.

4.4.4 Efecto del calcio sobre la movilidad tipo *twitching*.

La movilidad tipo *twitching* es otra característica vinculada a la virulencia de *R. solanacearum* (Liu et al., 2001; Kang et al., 2002). Esta característica se puede evaluar en función de la morfología de las colonias en crecimiento sobre placas de medio sólido. En este trabajo, se evaluó el efecto del calcio sobre la movilidad tipo *twitching* en las cepas GMI1000 y UY031 en placas de medio CPG (Figura 4.12). El borde de las colonias fue evaluado con microscopio óptico y se observó un efecto del calcio sobre las colonias de la cepa GMI1000. En CPG sin suplementar se observaron colonias con bordes claramente ondulados típico de las bacterias que realizan movilidad tipo *twitching*, mientras que las colonias crecidas en CPG suplementado con calcio presentaron un borde más liso y con menos ondulaciones (Figura 4.12-A). Por el contrario, en las colonias de la cepa UY031 no se observó una clara diferencia en la morfología del borde de las colonias en ambas condiciones (Figura 4.12-B).

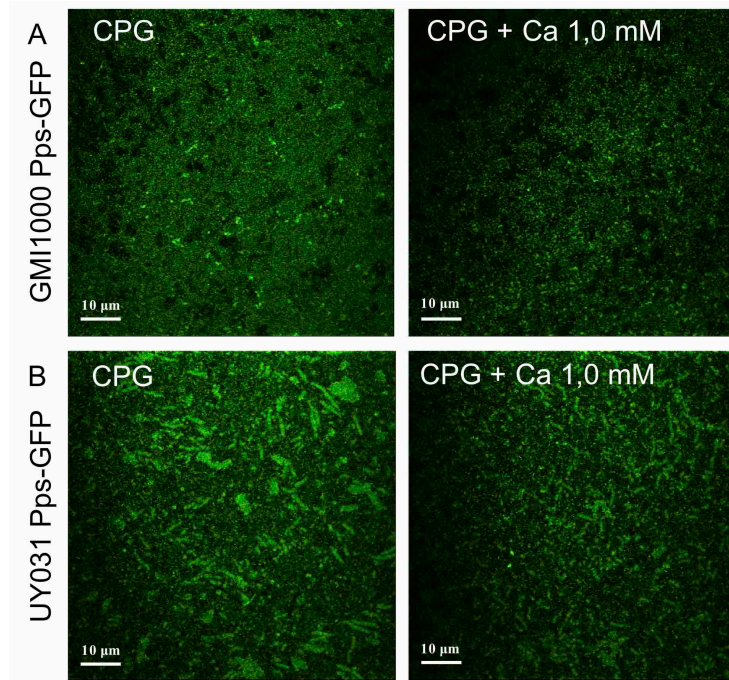


Figura 4.11. Evaluación del efecto del calcio en la estructura de *biofilm* mediante seguimiento por microscopía confocal de fluorescencia utilizando las cepas reporteras GMI1000 Pps-GFP **(A)** y UY031 Pps-GFP **(B)**. Las observaciones se realizaron en medio rico (CPG) y el mismo medio suplementado con CaCl_2 a una concentración final de 1,0 mM. Las imágenes fueron tomadas el tercer día de incubación con un objetivo 63X.

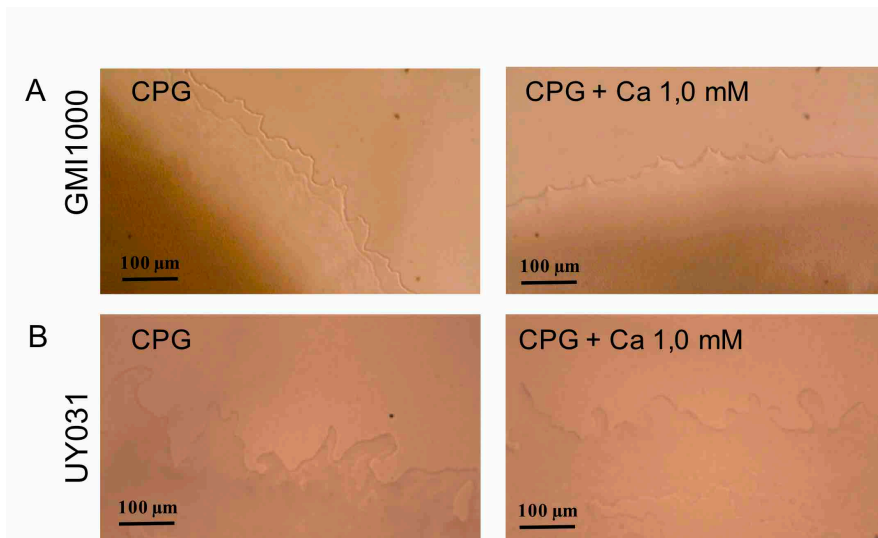


Figura 4.12. Efecto del calcio en la movilidad tipo *twitching* sobre placas de medio rico (CPG), seguimiento mediante observación del borde de colonias con microscopio óptico (objetivo 10X). **A:** Cepa de *Ralstonia pseudosolanacearum* GMI1000. **B:** Cepa de *Ralstonia solanacearum* UY031.

4.4.5 Cultivo de *R. solanacearum* bajo condiciones de flujo en cámaras de microfluído (CM).

En el caso de patógenos vasculares, el uso de CM permite estudiar el comportamiento de las bacterias bajo condiciones de flujo, imitando las condiciones que encuentra el patógeno dentro de la planta. Dado que no existen reportes previos de crecimiento de *R. solanacearum* en estas condiciones, fue necesario optimizar los parámetros críticos de operación de las CM teniendo en cuenta antecedentes de otras bacterias fitopatógenas como fue mencionado en el apartado 4.3.10. En el caso de *X. fastidiosa* se ajusta la concentración bacteriana inicial a una OD₆₀₀ de 0,6. *R. solanacearum* es de crecimiento más rápido por lo cual la primera prueba se realizó con una OD₆₀₀ de 0,5 y como hubo buen desarrollo a nivel de la CM se seleccionó este ajuste para futuros experimentos. Otro parámetro crítico es la velocidad de flujo, en el caso de *X. fastidiosa* la velocidad utilizada es 250 nl/min, por el mismo motivo anterior se decidió comenzar con una velocidad de flujo menor (200 nl/min). Como resultado se observó que las células no se adherían lavándose directamente por el canal del desecho, por lo que se decidió disminuir la velocidad de flujo a 100 nl/min (valor mínimo de funcionamiento del inyector del cultivo bacteriano). Como la velocidad de flujo de las células y el medio de cultivo deben ser similares se seleccionó la misma para ambos canales en los siguientes experimentos. El tiempo de seguimiento fue optimizado para cada tratamiento evaluado. Una vez ajustadas estas condiciones, se comparó el crecimiento de la cepa GMI1000 en medio CPG y MM. Como resultado se observó que a las 12 h de comenzar la evaluación las células estaban más adheridas a la cámara en el canal del MM y que en estas condiciones las células presentaban una morfología más redondeada y pequeña. En CPG se observó una morfología celular más alargada y una movilidad mayor (Figura 4.13-A). Hasta las 48 h de comenzado el experimento se observó el mismo comportamiento descrito a las 12 h pero la concentración bacteriana adherida en ambos canales fue mayor. Luego de las 65 h y hasta finalizar el experimento a las 96 h, se comenzó a observar que en el canal del CPG aumentó el número de células y en el canal de MM las células adheridas comenzaron a desprenderse. Finalmente, el canal de CPG terminó lleno de células y en el canal del MM se observaron células adheridas, pero en una concentración considerablemente menor que en CPG (Figura 4.13-B). El experimento culminó cuando ya no se observaron cambios en los canales.

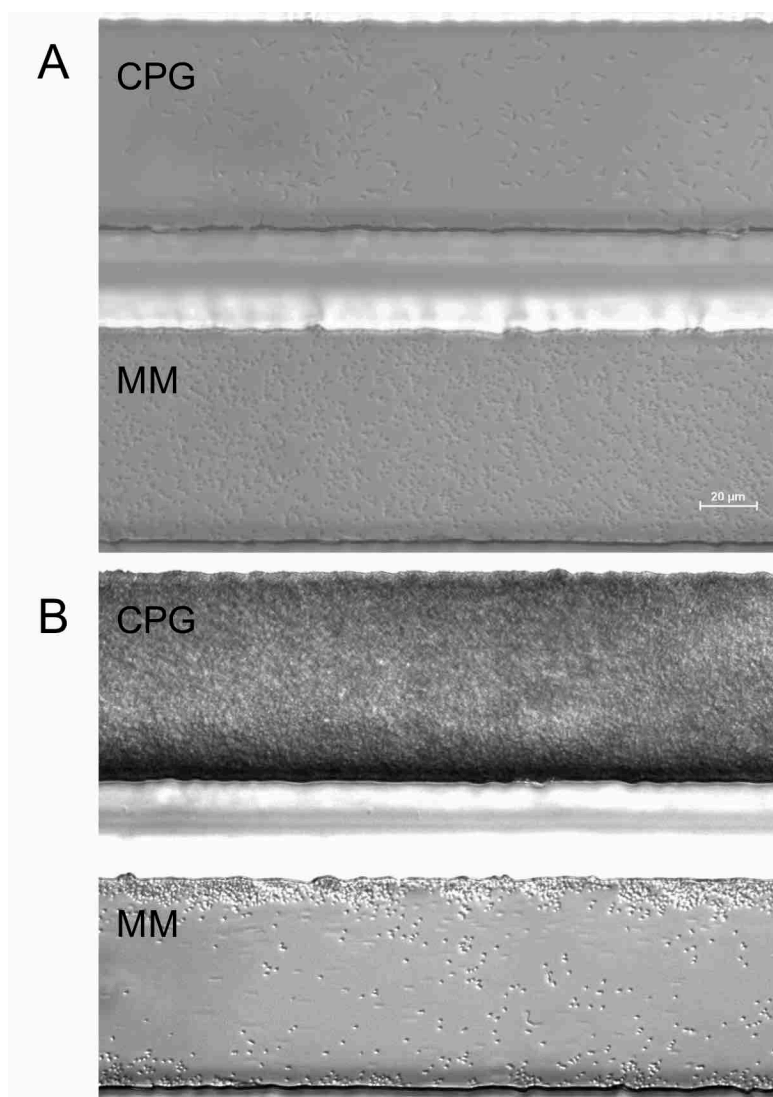


Figura 4.13. Crecimiento de *Ralstonia pseudosolanacearum* GMI1000 en cámara de microfluído con medio rico (CPG) y medio mínimo (MM). **A:** Imagen tomada a las 12 h luego de comenzar el experimento. **B:** Imagen tomada a las 96 h luego de comenzar el experimento. Se utilizó un objetivo 40X en ambas imágenes.

Posteriormente, se utilizaron las muestras de SX extraídas de los diferentes genotipos para evaluar el crecimiento de la bacteria en estas condiciones. Estas evaluaciones se repitieron numerosas veces utilizando SX de un genotipo susceptible (13001.79) y uno resistente (09509.6), observando en todos los casos que a lo largo del tiempo las células se despegaban y la concentración adherida a las cámaras resultó siempre muy baja (Figura 4.14). Sin embargo, se observaron claras diferencias en la morfología y movilidad de las células del patógeno en ambas condiciones. En el canal de la SX del genotipo parcialmente resistente 09509.6, se observó mayor movilidad de las células y además se observó la

misma morfología alargada encontrada en CPG (Figura 4.13-A). En la SX del genotipo 13001.79 susceptible, las células se adherieron más y mostraron una morfología más redondeada, similar a la observada en el MM (Figura 4.13-B).

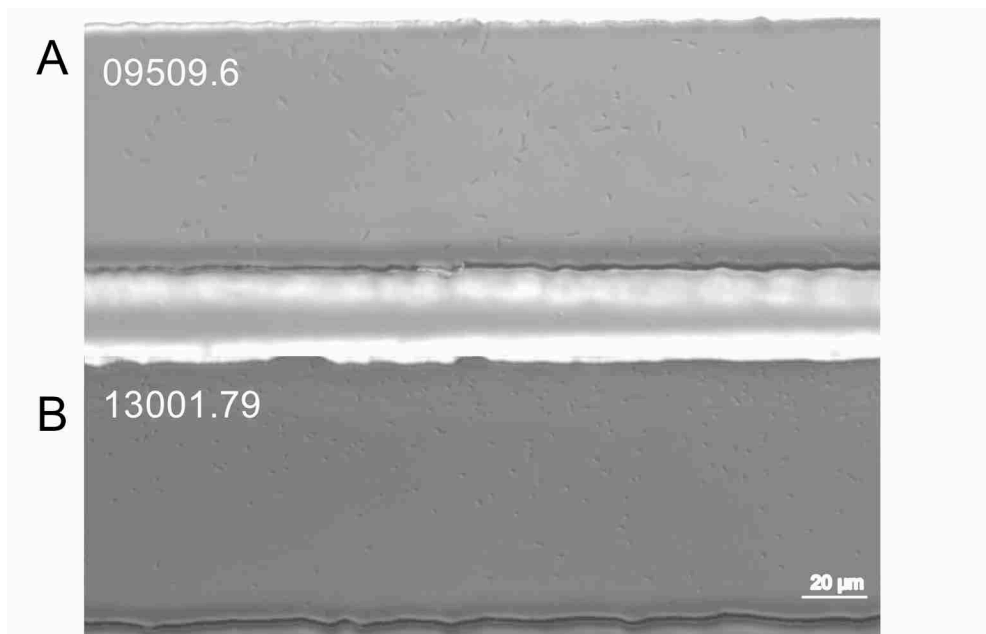


Figura 4.14. Crecimiento de *Ralstonia pseudosolanacearum* GMI1000 en cámara de microflujo con savia xilemática del genotipo parcialmente resistente 09509.6 (A) y del genotipo susceptible 13001.79 (B). Las imágenes fueron tomadas a las 96 h de iniciado el experimento utilizando un objetivo 40X.

4.4.6 Efecto del calcio sobre el crecimiento y la formación de *biofilm* en condiciones de flujo en cámaras de microflujo.

La evaluación del efecto del calcio se realizó comparando el crecimiento de la cepa GMI1000 en medio CPG y MM con los respectivos medios suplementados con una concentración final de CaCl_2 de 1,0 mM. En medio CPG sin suplementar la bacteria creció más rápido que en CPG suplementado con Ca y se caracterizó por un crecimiento celular adherido a las paredes de la cámara (Figura 4.15-A). La formación de *biofilm* se observó a partir de las 30 h luego de comenzado el experimento, luego se observó que el *biofilm* se desprendió y se volvió a formar reiteradas veces hasta las 72 h de evaluación en la que finalizó el experimento. En estas condiciones el *biofilm* no se observó fuertemente adherido, el flujo de la CM pudo desprender los acúmulos de células fácilmente en repetidas oportunidades. En MM no suplementado con Ca, se observó un aumento de las células adheridas luego de 56 h de comenzado el experimento, sin embargo, no se observó formación de *biofilm* en esta condición. Luego de 36 h en MM

suplementado con Ca, las células adheridas fueron observadas en la región más cercana a la pared de la cámara. Posteriormente, a las 56 h se observaron células adheridas a lo largo de todo el canal, pero en baja concentración, en comparación con el medio sin suplementar (Figura 4.15-B).

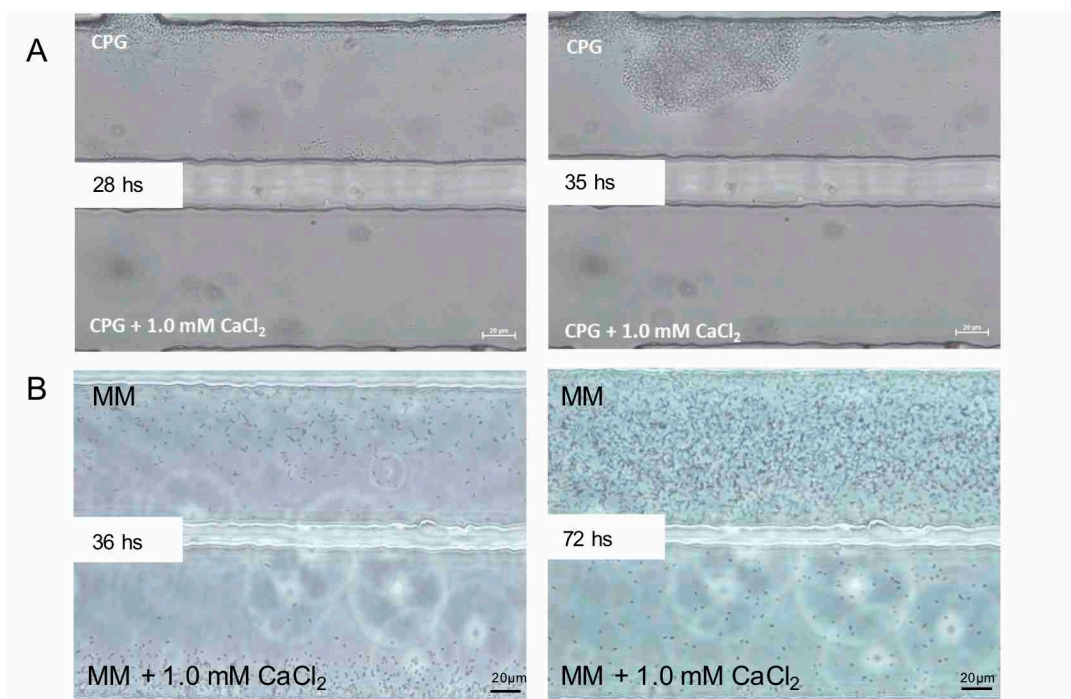


Figura 4.15. Efecto del calcio sobre el crecimiento de *Ralstonia pseudosolanacearum* GMI1000 en medio rico (CPG) y medio mínimo (MM) bajo condiciones de flujo en cámaras de microfluído. **A:** Medio CPG y CPG suplementado con CaCl₂ a una concentración final de 1,0 mM. Las imágenes fueron tomadas a las 28 y 35 h luego de iniciado el experimento. **B:** Medio MM y MM suplementado con CaCl₂ a una concentración final de 1,0 mM. Las imágenes fueron tomadas a las 36 y 72 h post inoculación. Todas las imágenes fueron tomadas con un objetivo 40X.

4.4.7 Efecto del calcio sobre la marchitez bacteriana.

Para evaluar el efecto del calcio sobre la resistencia, plantas del control susceptible *S. tuberosum* cv. Chieftain (Chieftain) y del genotipo parcialmente resistente 09509.6 fueron regadas periódicamente con suero fisiológico (SF) y SF suplementado con CaCl₂ 20 mM. A los 13 días las plantas fueron inoculadas y se evaluó el progreso de la enfermedad durante 28 días. Sobre estas plantas se tomaron muestras de hojas para evaluar la absorción de Ca de la planta antes y después de la inoculación.

El agregado exógeno de Ca produjo una disminución de los síntomas de marchitamiento respecto a las plantas sin tratar. Esto fue notorio en el genotipo parcialmente resistente (09509.6), donde todas las

plantas se mantuvieron asintomáticas luego de 28 dpi. En el control susceptible (Chieftain) el regado con Ca provocó un retraso de más de 10 días en la aparición síntomas y una reducción significativa en el progreso de la enfermedad (Figura 4.16; Tabla 4.3).

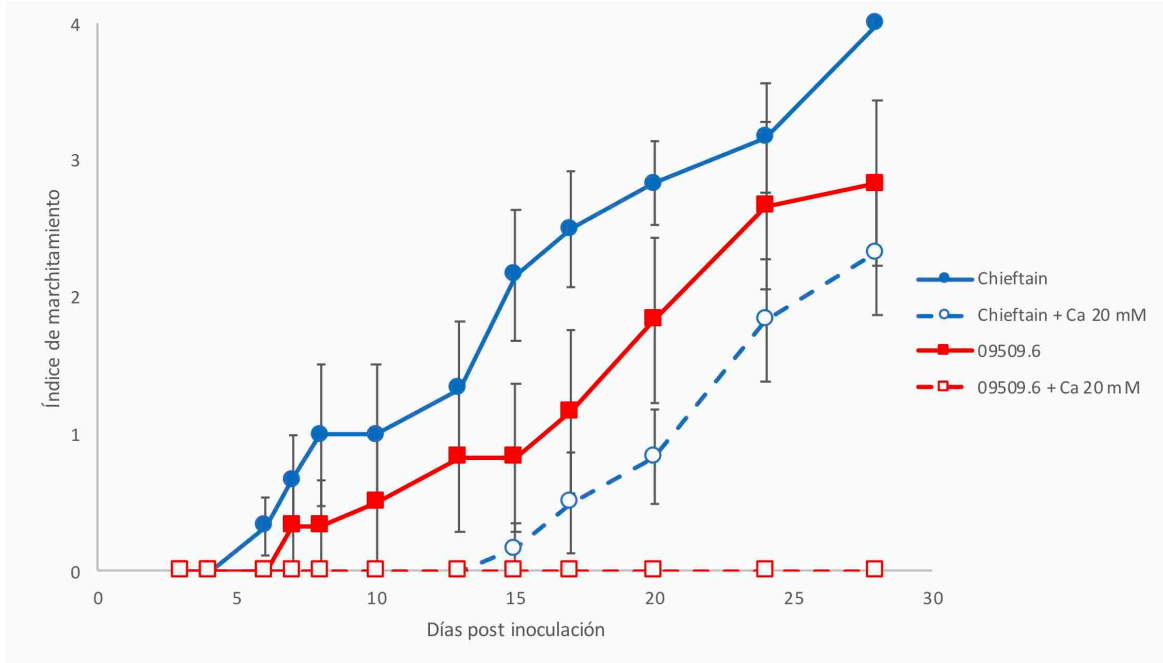


Figura 4.16. Evolución de los síntomas de marchitamiento en plantas del cv. susceptible Chieftain y del genotipo parcialmente resistente 09509.6 inoculadas con *Ralstonia pseudosolanacearum* GMI1000. Durante el ensayo las plantas fueron regadas periódicamente con una solución de CaCl₂ 20 mM o con suero fisiológico. Cada punto representa el promedio de 6 plantas y las barras verticales representan el error estándar.

Tabla 4.3. Evaluación del efecto del agregado exógeno de calcio sobre el nivel de resistencia a marchitez bacteriana.

Genotipo	Tratamiento ^a	AUDPC ^b
Chieftain	SF	49,67 C
Chieftain	CaCl ₂	16,5 AB
09509.6	SF	31,5 BC
09509.6	CaCl ₂	0 A

^aSF: plantas regadas periódicamente con suero fisiológico. CaCl₂: plantas regadas periódicamente con suero fisiológico suplementado con CaCl₂ 20 mM. ^bAUDPC: área bajo la curva de evolución de los síntomas de marchitamiento (Figura 4.16). Valores con la misma letra no son significativamente diferentes según el índice de comparación múltiple de Tukey's, $P=0,0003$.

Por otro lado, se analizaron los cambios en la concentración de calcio de los diferentes tratamientos para interpretar mejor el resultado observado a nivel de síntomas. Como era de esperar, todas las plantas que fueron tratadas con Ca mostraron un incremento en las concentraciones de este mineral a nivel de hoja. Las plantas del genotipo 09509.6 analizadas 15 días posteriores a la inoculación (15 DPI), son las que presentaron un menor cambio respecto a las plantas de este genotipo infectadas y tratadas con SF (26%), mientras que para el resto de las comparaciones el incremento observado fue del 45-52% (Figura 4.17-A). Todas las plantas mostraron un aumento en la concentración de Ca en la segunda medición realizada a los 15 DPI respecto a la primera medición realizada 1 día antes de la inoculación (1 DAI). El aumento más significativo se observó en las plantas del genotipo 09509.6 tratadas con SF, en las que se observó un incremento promedio de 47% de Ca a los 15 DPI (Figura 4.17-B). Para analizar el aumento de la concentración de Ca en función del genotipo, se compararon las concentraciones de Ca en plantas que recibieron el mismo tratamiento (SF o CaCl_2) y en cada uno de los momentos de evaluación (1 DAI y 15 DPI) (Figura 4.17-C). En todas estas comparaciones el genotipo 09509.6 mostró un aumento en la concentración de Ca respecto a plantas del cv. Chieftain. El mayor cambio (80%) se observó en plantas infectadas de 09509.6 tratadas con SF en comparación con plantas del cv. Chieftain que recibieron el mismo tratamiento. En las otras comparaciones el genotipo 09509.6 mostró un aumento entre el 34-49% respecto al cv. Chieftain. Estos resultados sugieren que la infección del patógeno puede inducir una mayor absorción de Ca en el genotipo parcialmente resistente tratado con SF.

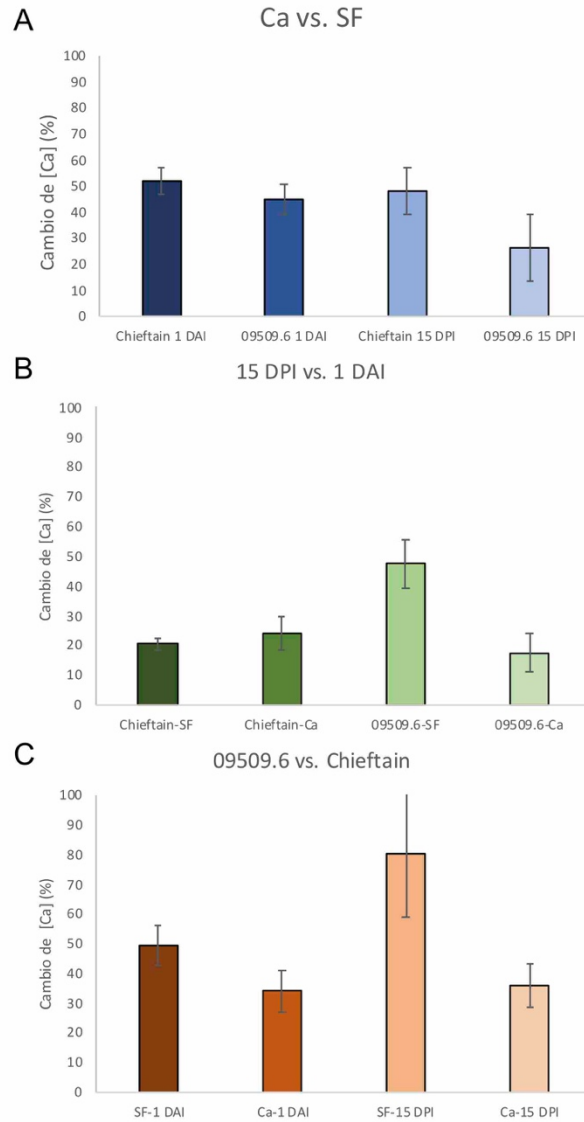


Figura 4.17. Análisis del cambio de la concentración de calcio a nivel de hojas en plantas del cv. susceptible Chieftain y del genotipo parcialmente resistente 09509.6 regadas periódicamente con una solución de CaCl_2 20 mM o con suero fisiológico (SF). Se evaluó la concentración de calcio en hoja 1 día antes de la inoculación (1 DAI) y 15 días posteriores a la inoculación (15 DPI) con *Ralstonia pseudosolanacearum* GMI1000. **A:** Comparación entre plantas regadas con Ca y plantas regadas con SF. **B:** Comparación de las concentraciones de Ca antes y después de la inoculación (1 DAI vs 12 DPI). **C:** Comparación entre plantas del control susceptible *Solanum tuberosum* cv. Chieftain (Chieftain) y el genotipo parcialmente resistente (09509.6). Cada columna representa el promedio del porcentaje de la concentración de Ca (n=6) y las barras verticales representan el error estándar.

4.5 - DISCUSIÓN

4.5. Discusión.

Trabajos recientes han destacado la utilidad de los estudios ionómicos como métodos de alta sensibilidad para trazar un perfil de la variación de la composición de minerales en varias especies de plantas. Estos estudios han evaluado cómo el material genético de la planta puede afectar el contenido mineral de variadas especies comerciales incluyendo arroz, maíz, soja, sorgo, repollo, tomate, berenjena, etc. Entre los resultados encontrados, observaron variabilidad en el contenido mineral entre cultivares de la misma especie, destacando los estudios ionómicos como herramientas útiles para la selección de variedades que contengan los minerales adecuados para lograr un buen valor nutricional para consumo humano, sin altas concentraciones de elementos tóxicos o radioactivos (Ziegler et al., 2013; Baxter et al, 2014; Asaro et al., 2016; Shakoor et al., 2016; Watanabe et al., 2016). Por otro lado, los estudios ionómicos permiten demostrar interacciones entre varios minerales en el organismo, reconocer genes relacionados en el transporte de minerales y la homeostasis de la planta y estudiar la influencia del ambiente y la variación genética en la acumulación de minerales a nivel de diferentes tejidos (Watanabe et al., 2016). Hasta el momento no existen reportes de estudios ionómicos de hoja, raíz y tallo en plantas de papa. Recientemente, se realizó un análisis del ionoma a nivel de tubérculos de diferentes variedades comerciales, como aproximación para mejorar las características nutricionales (Chaparro et al., 2018). En esta tesis se analizó el ionoma de una variedad de papa comercial (*Solanum tuberosum* cv. Chieftain) y 2 genotipos provenientes del programa de mejoramiento; 13001.79 (susceptible) y 09509.6 (parcialmente resistentes). Se analizaron muestras de savia xilemática, hoja, raíz y tallo y se encontró que los minerales más abundantes en todos estos tejidos fueron K, P, S, Mg y Ca. Cuando se compararon los ionomas de los distintos genotipos se encontró que la concentración de Ca del genotipo parcialmente resistente 09509.6 es significativamente mayor que la concentración en los genotipos susceptibles. Este hallazgo se encontró específicamente en las muestras de SX y tallo, coincidiendo con el nicho en el cual *R. solanacearum* se establece a nivel de la planta, lo que nos llevó a hipotetizar que la resistencia a este patógeno podría estar asociada a una mayor concentración de Ca en estos tejidos.

En contraste con otros macronutrientes, una alta concentración de calcio total del tejido de la planta está localizado en la pared celular (apoplasto). Las principales funciones del calcio en el apoplasto son mantener la integridad del plasmalema y estabilizar las pectinas intra e intermolecularmente. La deficiencia de calcio en la planta produce una reducción el crecimiento y también puede generar

oscurecimiento y necrosis de áreas del tejido de la planta (Brown et al., 2012). Este mineral está involucrado en variadas funciones celulares y varios estudios han demostrado su asociación con la tolerancia a condiciones ambientales adversas, promoción de crecimiento de la planta y tuberización y resistencia a otras enfermedades (Brown et al., 2012; Bilski, et al, 1988; Dyson y Digby, 1975; Kleinhenz y Palta, 2002; Locascio et al., 1992; Simmons y Kelling, 1987; Simmons et al., 1988; Tawfik et al., 1996; Teige, 2019; Tzeng et al., 1986; Vega et al. 1996; Yencho et al., 2008). En relación a su rol en los mecanismos de defensa, el calcio mejora la estructura y la integridad de los componentes de la pared celular de las plantas, lo que resulta en una mayor resistencia a las enfermedades que involucran la maceración de los tejidos (Czajkowski et al., 2011; He et al., 2014). Por otro lado, las plantas emplean el calcio como segundo mensajero en la transmisión de señales endógenas (de desarrollo) y exógenas (ambientales) (Kim et al., 2009, Zhang et al., 2018). La señalización de calcio es esencial en las respuestas PTI y ETI. Evidencias emergentes sugieren que las proteínas quinasas dependientes de calcio específicas y comunes fosforilan sustratos distintos para regular diversas respuestas inmunes de las plantas, incluida la producción de ROS, la reprogramación transcripcional de genes de la inmunidad y la respuesta hipersensible (Gao et al., 2014).

Por los resultados antes mencionados obtenidos en esta tesis, por la dependencia del Ca a acumularse en las zonas de transporte xilemático y dado que la bacteria se localiza y prolifera en el tallo de la planta en contacto con la SX, se decidió continuar evaluando el efecto del Ca sobre el crecimiento, la virulencia de la bacteria y la resistencia a la marchitez bacteriana.

Se realizaron curvas de crecimiento en medio rico (CPG) y medio mínimo (MM) suplementado con Ca (1,0 mM). Como resultado se observó que el Ca no generó ningún efecto sobre el crecimiento de *R. solanacearum* en medio rico en ninguna de las cepas analizadas (GMI1000 y UY031). Sin embargo, cuando el crecimiento fue evaluado en MM suplementado con Ca, se observó una disminución del crecimiento en ambas cepas no superando el 50% de la OD₆₀₀ alcanzada en el MM sin suplementar. La diferencia entre los resultados del CPG y MM puede deberse a que la bacteria logra adquirir todos los nutrientes necesarios para crecer en CPG con agitación y la concentración de Ca agregada no afecta el crecimiento en estas condiciones. El efecto del Ca en MM podría justificarse porque la composición del MM ya de por sí afecta el crecimiento de la bacteria logrando una OD₆₀₀ 3 veces menor a la alcanzada en CPG. Este medio intenta acercarse a las condiciones encontradas por la bacteria en contacto con la planta

en donde las fuentes de carbono y energía disponibles son limitantes, y es en estas condiciones en las que el Ca parecería estar ejerciendo un efecto inhibitorio en la multiplicación de este patógeno. En un estudio donde se evaluó el efecto del Ca sobre el crecimiento *in vitro* de *R. solanacearum* en un medio rico (PS, *potato sucrose*), se observó que el crecimiento fue significativamente disminuido por el Ca a partir de una concentración de 5,0 mM (He et al., 2014). En la evaluación realizada en nuestro trabajo el Ca no afectó el crecimiento de la bacteria en medio rico, pero la concentración utilizada para suplementar fue 1,0 mM. Este valor fue seleccionado teniendo en cuenta la concentración de Ca cuantificada en la SX del genotipo resistente.

También se evaluó el efecto del Ca sobre la capacidad de formación de *biofilm*, un aspecto central en la virulencia de *R. solanacearum* ya que contribuye al mantenimiento y proliferación de las poblaciones del patógeno en los tejidos infectados (Lowe-Power et al, 2018b). En una primera instancia se evaluó la formación de *biofilm* mediante ensayos en placa de microtitulación y utilizando diferentes medios de crecimiento incluyendo CPG, MM suplementado con diferentes fuentes de carbono y energía, así como en SX de genotipos con diferentes niveles de resistencia a *R. solanacearum*. A partir de estos ensayos se concluyó que la formación de *biofilm* sólo se logró cuantificar confiablemente cuando se utilizó el medio rico CPG como medio de crecimiento. Esto coincide con lo reportado en la mayoría de los trabajos publicados en los que utilizan esta metodología para evaluar la formación de *biofilm* en cepas de *R. solanacearum* (Yao y Allen, 2007; Tran et al., 2016; Khokhani et al., 2017).

El efecto del Ca en la formación de *biofilm* fue evaluado en las cepas GMI1000 y UY031 en CPG. Como resultado se observó que hay una reducción en la formación de *biofilm* en el medio rico suplementado con calcio, pero esto ocurre únicamente para la cepa GMI1000. En la cepa UY031 no se observó ningún efecto del Ca sobre la formación de *biofilm*. Esto fue observado en experimentos en placas de microtitulación. El seguimiento por microscopía confocal de fluorescencia se utilizó como herramienta complementaria ya que permite realizar un seguimiento de la estructura del *biofilm* formado en las diferentes condiciones. En la cepa GMI1000 Pps-GFP se observó claramente la formación de una estructura continua de células compactadas a lo largo de los días en CPG. En CPG suplementado con calcio se observaron menos células compactadas, pudiendo así concluir que la formación del *biofilm* es menor o más lenta. Para la cepa UY031 Pps-GFP los resultados no fueron tan claros ya que a lo largo de los días no se vieron diferencias evidentes entre los tratamientos. Por otro lado cuando se evaluó el

efecto del Ca sobre la movilidad tipo *twitching* se observó la misma tendencia observada en los ensayos anteriores. En las colonias de la cepa GMI1000 en CPG sin suplementar se pudo observar claramente el borde ondulado típico de las bacterias que realizan movilidad tipo *twitching* y en las colonias crecidas en CPG suplementado con calcio se encontró un borde levemente ondulado. En las colonias de la cepa UY031 no se observó una clara diferencia entre la morfología del borde de las colonias en CPG y CPG suplementado con Ca. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la cepa GMI1000 tiene una mayor afectación por el Ca de varias características asociadas a la virulencia, en comparación con la cepa UY031. En base a estos resultados, en este trabajo se continuó trabajando con la cepa GMI1000. Sin embargo, sería interesante profundizar en esta diferencia en futuros estudios.

La virulencia de *R. solanacearum* depende de un amplio repertorio de factores de virulencia, incluyendo la secreción de enzimas que degradan la pared celular, el exopolisacárido EPS que participa en la formación de *biofilm* y taponamiento de los haces de xilema, así como un gran número de proteínas efectoras secretadas dentro de la célula hospedera por el sistema de secreción de tipo III (Deslandes y Genin, 2014). En un estudio previo se demostró que el Ca disminuye la actividad pectinasa en *R. solanacearum*, interfiriendo en la degradación de la pared celular vegetal y pudiendo ocasionar un retraso en la invasión de los tejidos del hospedero (He et al., 2014). Estos resultados en conjunto con los observados en este trabajo, confirman el efecto del Ca sobre el crecimiento y la virulencia de este patógeno.

R. solanacearum coloniza el sistema vascular de la planta hospedera y sobrevive dentro de los haces xilemáticos en condiciones de flujo continuo, por lo cual este trabajo continuó con el análisis del comportamiento de la bacteria en CM bajo condiciones de flujo. Estos dispositivos construidos a través de técnicas de nanotecnología, consisten en un compartimiento sellado a través del cual se hace circular un fluido bajo determinadas condiciones de flujo. El sistema constituye una herramienta muy valiosa para el estudio de actividades que son centrales en el proceso de infección en patógeno vasculares ya que ofrecen la posibilidad de imitar el ambiente de la planta y monitorear de forma continua el comportamiento del patógeno bajo condiciones de flujo (De La Fuente et al., 2007; Cogan et al., 2013). Los estudios de biofísica bacteriana han demostrado que el flujo afecta muchos rasgos que *R. solanacearum* requiere para la patogénesis. Por ejemplo, el flujo de la SX cerca de las superficies genera fuerzas de corte que promueven la unión bacteriana a las paredes de los haces de xilema (Rusconi y Stocker, 2015). El flujo

de la SX también orienta las células bacterianas estableciendo la dirección de sus movimientos y de la natación, cambia la forma de los *biofilms*, aumenta la disponibilidad de nutrientes y diluye los productos de desecho difusibles, los metabolitos secundarios y las moléculas bioactivas como las señales que median el *quorum sensing* (Lowe-Power et al., 2018b).

Dado que esta bacteria no había sido evaluada previamente en estas condiciones fue necesario en una primera instancia optimizar el procedimiento. El flujo de la SX está influenciado por factores ambientales que incluyen la humedad ambiental, la temperatura y el ciclo circadiano. Se ha reportado que durante el día, la SX en plantas de tomate fluye a una velocidad lineal promedio de 5 mm/seg, pero disminuye a aproximadamente un tercio de su tasa máxima en la noche (Lowe-Power et al., 2018b). En papa no se ha descrito la velocidad a la que fluye la SX, pero al optimizar los experimentos en las CM se eligió el valor mínimo posible del inyector dado que la bacteria no se adhería fuertemente a las paredes de la cámara. En este caso no solo la SX y la velocidad de flujo afectan la adhesión de la bacteria, sino que ésta también puede estar influenciada por el material que están construidas las CM (PDMS). En futuras evaluaciones, sería interesante evaluar otros materiales alternativos que permitan una mayor adherencia de esta bacteria.

Para comenzar con las evaluaciones, se comparó el crecimiento de la cepa GMI1000 en medio CPG y MM, encontrando diferencias apreciables en la morfología celular, movilidad y adherencia de esta bacteria en ambas condiciones. En el canal de MM al comenzar el experimento las células estaban más adheridas en MM y tenían una morfología más redondeada y pequeña, mientras que en CPG se observó una morfología celular más alargada y una movilidad mayor. Al finalizar el experimento, se observó un aumento del número de células en el canal del CPG y en el canal de MM las células adheridas comenzaron a despegarse.

Como se ha descrito, *R. solanacearum* regula activamente varios de sus factores de virulencia a través del factor transcripcional PhcA, el cual es activado por un mecanismo de *quorum sensing* cuando la bacteria se encuentra en altas concentraciones (Genin y Denny, 2012). En un trabajo reciente se construyó una cepa mutante *phcA* con el objetivo de estudiar el comportamiento de la bacteria cuando está siempre en una condición de baja concentración, como por ejemplo cuando se encuentra en el suelo (Khokhani et al., 2017). En este trabajo se observó que la cepa mutante *phcA* se focaliza en obtener nutrientes y adherirse a la superficie de la planta, creciendo más rápido en las primeras etapas de la

colonización. Dentro de los haces xilemáticos de plantas de tomate se observó mediante microscopía electrónica que la cepa mutante era un 25% más corta en su largo y más redondeada en comparación con la cepa silvestre. Adicionalmente, la cepa mutante se observó en algunos haces de xilema formando acúmulos de células mayormente adheridos, mientras la silvestre se observó colonizando la mayoría de los haces de xilema formando agregados de células más flojos (Khokhani et al., 2017). Los resultados observados en esta cepa mutante pueden ser comparables a los observados en este trabajo donde se observó la misma morfología más redondeada, mayor adhesión y menor movilidad de la bacteria cuando fue evaluada bajo condiciones de flujo en MM, sugiriendo que en este medio pobre en nutrientes la bacteria se comporta como en la condición de baja densidad celular. Por el contrario, la morfología más alargada y la mayor movilidad normalmente observada cuando la bacteria se encuentra en la condición de alta densidad celular, en este trabajo se corresponde con el patrón observado en medio rico CPG. Este cambio a una morfología celular más corta y redondeada también se asoció previamente a un mecanismo de supervivencia inducido en un ambiente pobre en nutrientes, como la sobrevivencia en cursos de agua por largos períodos de tiempo (Alvarez et al., 2008). Se ha reportado q la condición de baja densidad celular tiene una estrategia metabólica que le permite a la bacteria utilizar más de 23 diversos nutrientes. Esta amplia capacidad metabólica le otorga ventajas en el momento de sobrevivir en el suelo y agua donde los nutrientes disponibles son impredecibles y pueden agotarse por los microorganismos competidores. Por otro lado, se ha demostrado que la condición de alta densidad celular utiliza un número reducido de nutrientes, entre ellos sacarosa, galactosa y trealosa (Khokhani et al., 2017; Lowe-Power et al., 2018a; Lowe-Power et al., 2018b).

También se utilizaron muestras de SX como medio para el crecimiento de *R. solanacearum* en CM para intentar aproximarnos aún más al ambiente dentro de la planta. Como resultado se observó que tanto en el canal del genotipo susceptible (13001.79) como en el canal del genotipo parcialmente resistente (09509.6) la concentración bacteriana adherida fue muy baja y a lo largo del tiempo comenzaba a desprenderse. A su vez, en la SX del genotipo susceptible las células se adhirieron y mostraron una morfología similar a la observada en el MM, mientras que en el canal del genotipo parcialmente resistente se observó mayor movilidad de las células y además se observó la misma morfología alargada encontrada en CPG. Tanto en la SX del genotipo 09509.6 como en la 13001.79 debería hacerse un análisis metabólico para determinar que metabolitos están presentes en cada una de las SX. Una hipótesis de

los resultados observados en la CM con la SX de 09509.6 es que la SX de este genotipo contiene alguno de los metabolitos que induce la condición de alta densidad celular lo que haría que la bacteria cambie su comportamiento en ese medio. Por otro lado, en un trabajo reciente, se demostró que esta bacteria crece mejor en SX extraída a partir de plantas infectadas, en comparación con la SX extraída de plantas sin inocular (Lowe-Power et al., 2018a). En esta tesis se intentó extraer SX a partir de plantas de papa infectadas con *R. solanacearum* pero con poco éxito, no alcanzando a coleccionar el volumen necesario para realizar los experimentos de incubación en CM. Por este motivo, los experimentos fueron realizados con muestras de SX extraídas de plantas sanas, lo que podría estar explicando el pobre crecimiento observado en estas condiciones.

Posteriormente, se utilizó este abordaje para realizar la evaluación del efecto del calcio en el crecimiento de *R. solanacearum* bajo condiciones de flujo. Se observó una disminución en la adhesión y multiplicación de la bacteria en los medios CPG y MM suplementados con calcio, en comparación con los mismos medios sin suplementar. Al comparar los resultados obtenidos mediante las CM y las curvas de crecimiento en placas de microtitulación, encontramos que el efecto del calcio sobre el crecimiento de *R. solanacearum* en CPG fue observado únicamente en las CM ya que en las placas de microtitulación con agitación no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Este hecho puede deberse a que la bacteria logra adquirir todos los nutrientes necesarios para crecer en CPG con agitación y la concentración de Ca agregada no afecta el crecimiento en estas condiciones. Por otro lado, bajo condiciones de flujo continuo en CM no solo estamos evaluando que la bacteria se multiplique, sino además su adhesión y posible formación de *biofilm*. Por esta metodología observamos que al agregar Ca, tanto la adhesión como el crecimiento se ven afectados y en el canal con CPG se observó que la bacteria se adhiere, multiplica y además forma *biofilm*. Bajo condiciones de flujo continuo la concentración de Ca agregada es capaz de afectar el comportamiento de *R. solanacearum*. Cabe destacar que la tecnología de las CM hasta el momento no se había aplicado al estudio de *R. solanacearum*, por lo que a través de esta tesis se apuesta a implementar un nuevo sistema modelo para el estudio de este patógeno bajo condiciones de flujo.

Para evaluar el efecto del calcio sobre la resistencia de la marchitez bacteriana, plantas del control susceptible y del genotipo parcialmente resistente 09509.6 fueron tratadas con Ca y luego inoculadas con la bacteria. Además, se tomaron muestras de hojas para analizar la absorción de Ca de la planta antes y

después de la inoculación. El tratamiento con Ca mostró un retraso y una reducción significativa del progreso de la enfermedad en el control susceptible y una disminución de los síntomas en el genotipo parcialmente resistente, donde todas las plantas se mantuvieron asintomáticas. Cuando la concentración de calcio fue cuantificada en estas plantas se observó que todos los genotipos mostraron una concentración mayor luego de la inoculación, independientemente del tratamiento recibido (Ca o SF). La mayor concentración de Ca se observó en las plantas del genotipo 09509.6 tratado con SF luego de la inoculación. A su vez, si comparamos los genotipos, 09509.6 mostró una mayor absorción de Ca en ambos tratamientos y en las plantas sanas o infectadas. Estos resultados sugieren que la infección del patógeno puede inducir una mayor absorción de Ca en el genotipo parcialmente resistente tratado con SF en comparación con las plantas tratadas con Ca. Las plantas poseen sensores de Ca, los cuales están involucrados en las respuestas a patógenos más tempranas que ocurren en la célula de la planta (Aldón et al., 2018). Una hipótesis de los resultados antes mencionados sería que las plantas del genotipo parcialmente resistente pueden haber censado la concentración de Ca luego de la inoculación y como las plantas tratadas ya tenían aumentada la concentración de Ca, se puede haber generado una respuesta para absorber más Ca en las plantas tratadas con SF, lo que llevó a un mayor porcentaje de cambio en la concentración de Ca en éstas últimas.

Muchos estudios han demostrado que el aumento del contenido de calcio en los tejidos vegetales disminuye otras enfermedades en papa, incluidas la pierna negra y la podredumbre blanda causada por *Pectobacterium spp.* y *Dickeya spp.* (Pagel y Heitefuss, 1989; Bain et al., 1996; Czajkowski et al., 2011), tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* (Chai y Doke, 1987), y podredumbre anular causada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Filinova et al., 2018). Por otro lado, se ha investigado el efecto de tratamientos con calcio en la marchitez bacteriana en tomate, encontrando que la resistencia y la disminución de la población del patógeno en el xilema se correlacionó con una mayor absorción de calcio por la planta (Yamazaki y Hoshina, 1995; Yamazaki et al. 2000). El tratamiento con calcio aumentó significativamente la concentración de este mineral en los tejidos de raíces y brotes de tomate, mejoró la tasa y la cantidad de acumulación de H₂O₂, lo que condujo a la reducción de la severidad de la marchitez bacteriana de un cultivar de tomate susceptible (Jiang et al, 2013). Además, el calcio se ha relacionado con la supresión de la supervivencia de *R. solanacearum* en el suelo (Liu et al., 2016), la disminución de la población de *R. solanacearum* y la severidad de la enfermedad en plantas de jengibre y tabaco

(Vudhivanich, 2002; He et al., 2014). Por el contrario, no hay información disponible sobre el efecto del calcio sobre la marchitez bacteriana en genotipos de papa. Por lo tanto, este trabajo significa un punto de partida para continuar investigando el rol del calcio en este patosistema, conocimiento que puede ser aplicado a la definición de nuevas estrategias de manejo que contribuyan al control integrado de la marchitez bacteriana en cultivos de papa.

CAPÍTULO 5

Discusión general, conclusiones y perspectivas

5.1 Discusión general.

Esta Tesis estuvo enmarcada en un trabajo multidisciplinario enfocado a generar conocimiento y herramientas que contribuyan al desarrollo de nuevas variedades de papa con resistencia a la marchitez bacteriana causada por *R. solanacearum*.

Se evaluó la resistencia en el germoplasma generado en el programa nacional de mejoramiento genético de papa de INIA, incluyendo 854 genotipos que abarcaron accesiones silvestres de *S. commersonii*, *S. chacoense* y *S. malmeanum*; cultivares comerciales y materiales de referencia de otros programas de mejoramiento; y progenies obtenidas a partir de cruzamientos anuales interspecíficos. Por otro lado, se implementó la detección de infección latente como nuevo criterio de selección en el programa de mejoramiento apuntando a evitar la selección de genotipos únicamente basados en los síntomas de marchitamiento, dado que las infecciones latentes causadas por *R. solanacearum* podrían promover la diseminación del patógeno en condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad. En este trabajo, a lo largo de los años, se realizaron *screenings* donde se encontraron genotipos con resistencia parcial altamente tolerantes que han mostrado una baja proporción de plantas marchitas, los cuales fueron seleccionados como fuentes de resistencia y utilizados como progenitores en los cruzamientos realizados posteriormente en el programa de mejoramiento de INIA. Progenies más avanzadas generadas a partir de los progenitores seleccionados en este trabajo, fueron evaluadas recientemente en ensayos a campo en Brasil, donde la enfermedad es endémica y el patógeno se encuentra presente en el suelo. Estas evaluaciones permitieron seleccionar materiales correspondientes a retrocruzas BC3 y BC4 que presentaron una muy baja proporción de plantas marchitas y tubérculos con buenas características morfológicas, que seguirán siendo evaluadas para la liberación de nuevos cultivares comerciales. El uso de variedades de papa parcialmente resistentes en combinación con la rotación de cultivos, semillas libres de patógeno, la utilización de agentes de control biológico y buenas prácticas agronómicas, constituye una herramienta valiosa para el control de la marchitez bacteriana en Uruguay así como en otras regiones del mundo en donde la enfermedad es endémica.

Por otro lado, en este trabajo se construyeron y validaron cepas reporteras de *R. solanacearum* con actividad fluorescente y luminiscente mediante integración de los sistemas reporteros en una región permisiva del genoma de la cepa UY031. Cuando se realizó la detección *in planta* de las cepas reporteras con actividad fluorescente se verificó que la bacteria puede ser monitoreada mediante microscopía

confocal, logrando analizar con mayor detalle la distribución espacial del patógeno y visualizar claramente células independientes en los tejidos infectados. La cepa reportera luminiscente, permitió el seguimiento del patógeno *in vivo* en una misma planta a lo largo del tiempo y la cuantificación de la luminiscencia emitida pudo ser correlacionada con la concentración bacteriana en los tejidos infectados. Además, en todas las plantas infectadas se observó una correlación entre el aumento de la luminiscencia a lo largo del tiempo y el desarrollo de los síntomas. Esta cepa fue fácilmente identificada tanto en el tallo como en la raíz de los genotipos de papa antes de la aparición de síntomas, mientras que en las plantas asintomáticas la infección fue detectada principalmente a nivel de raíces. La aplicación de las cepas reporteras para el monitoreo del patógeno sobre el material resultante de programas de mejoramiento aporta una alternativa rápida, fácil de realizar e innovadora para el *screening* de resistencia a *R. solanacearum*, mejorando el criterio de selección de genotipos potencialmente resistentes mediante la detección de infecciones latentes.

En este trabajo se utilizaron estas cepas reporteras para el seguimiento de la colonización de la bacteria en genotipos con diferentes niveles de resistencia. En los genotipos susceptibles la transición a planta sintomática se relacionó con la multiplicación extensiva del patógeno a lo largo del tallo, alcanzando muy altas concentraciones luego de la inoculación. En los genotipos con resistencia parcial, la colonización alcanzó hasta la base del tallo, caracterizándose por una menor concentración y extensión de tejido afectado. En las raíces, los patrones de colonización y distribución del patógeno entre genotipos susceptibles y con resistencia parcial no tuvieron diferencias. Estos resultados fueron obtenidos a través de la cuantificación de luminiscencia, observaciones mediante microscopía confocal y recuento en placa. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la resistencia a la marchitez bacteriana en papa está relacionada con la capacidad de la planta de restringir la colonización y multiplicación del patógeno, particularmente limitando la diseminación a lo largo del tallo. Estas diferencias en los patrones de colonización también se asocian con el tipo de respuestas de defensa inducidas encontradas en estos genotipos. El genotipo con resistencia parcial 09509.6 mostró cambios estructurales significativos, se observó división celular con generación de alta cantidad de nuevos haces vasculares, deposición de lignina y engrosamiento de los haces xilemáticos con la presencia de haces ocluidos con tálides con forma circular. En estas plantas también se observó mayor producción de ROS inducida luego de la infección con *R. solanacearum* así como aumento del intercambio de electrolitos a través de la membrana. Por otro

lado, se encontraron diferencias significativas en el patrón de expresión de genes relacionados con las respuestas de defensa de la planta. Se observó una inducción significativa de un gen que codifica para una enzima involucrada en la vía metabólica de las auxinas, en el genotipo susceptible cv. Chieftain luego de la inoculación, mientras que en el genotipo con resistencia parcial 09509.6 su expresión se mantuvo incambiada respecto a plantas del mismo genotipo sin inocular. Se ha demostrado que este gen se induce como respuesta a la infección de varios patógenos y está relacionado con el desarrollo de la enfermedad a través de la regulación de la expresión de genes relacionados con la virulencia del patógeno (Gonzalez-Lamothe et al., 2012). Este resultado es concordante con la observación de síntomas luego de la infección con *R. solanacearum* en el genotipo susceptible cv. Chieftain y la baja proporción de plantas marchitas encontradas en los genotipos con resistencia parcial. Por otro lado, el gen 5 fue inducido por la infección con *R. solanacearum*, únicamente en el genotipo con resistencia parcial, este gen codifica para una enzima poligalacturonasa, que participa de la degradación, modificación y ensamblado de los polímeros de pectina que forman la pared de la célula vegetal (Handfield y Bennett, 1998). La inducción de la expresión de este gen podría asociarse a una respuesta de la planta frente a la bacteria, dado que *R. solanacearum* puede producir poligalacturonasas como factores de virulencia, para generar de manera más rápida enzimas inhibidoras de poligalacturonasas en la planta (Schacht et al., 2011; Digonnet et al., 2012). Otra interpretación de este resultado sería que la inducción de la producción de poligalacturonasas en genotipos con resistencia parcial podría estar relacionada a la degradación de la pared celular asociada a una respuesta de hipersensibilidad. Este resultado además sería concordante con el aumento del intercambio iónico encontrado en este genotipo. En conjunto, estos resultados sugieren que en estas plantas con resistencia parcial existe un reconocimiento del patógeno que se refleja en cambios a nivel estructural, bioquímico y de alteración de la expresión génica, y que logran limitar la multiplicación y diseminación del patógeno en los tejidos aéreos a través del sistema vascular.

En este trabajo también se realizó un estudio comparativo del perfil de minerales en plantas susceptibles y resistentes. Se analizaron muestras de savia xilemática, hoja, raíz y tallo y se encontró que los minerales más abundantes fueron K, P, S, Mg y Ca en todas las muestras analizadas. Cuando se compararon los iones de los distintos genotipos se encontró que la concentración de Ca del genotipo parcialmente resistente 09509.6 es significativamente mayor que la concentración de los otros genotipos tanto en la

savia xilemática como a nivel del tallo, lo que sugiere una correlación entre la resistencia del genotipo y la concentración de este mineral.

En base a este hallazgo se realizaron diferentes estudios para evaluar el rol del Ca en esta interacción planta – patógeno. Se observó que el Ca tiene un efecto significativo como inhibidor del crecimiento del patógeno en medio mínimo. También se observó una disminución en la capacidad de formación de *biofilm* y movilidad tipo *twitching*, características asociadas con la virulencia de este patógeno. Este efecto fue observado únicamente para la cepa GMI1000.

Por otro lado, el patógeno fue evaluado también bajo condiciones de flujo en cámaras de microfluído. Se optimizaron las condiciones de crecimiento y se evaluó el crecimiento de la bacteria en medios diferentes. En medio rico y savia xilemática del genotipo con resistencia parcial se observó una morfología más alargada y mayor movilidad en comparación con medio mínimo y savia xilemática del genotipo susceptible, donde se observó una morfología más redondeada y pequeña con mayor adhesión. Estos resultados se relacionaron con la condición de alta y baja densidad celular asociada al *quorum sensing* (Khokhani et al., 2017). También se utilizó este modelo para evaluar el efecto del Ca bajo condiciones de flujo. Como resultado se observó una disminución de la adhesión y la multiplicación de la bacteria en ambos medios. Cabe destacar que la tecnología de cámaras de microfluído hasta el momento no se había aplicado al estudio de este patógeno, por lo que a través de esta tesis se apuesta a implementar un nuevo sistema modelo para su estudio bajo condiciones de flujo.

Por último, se realizaron ensayos de inoculación para evaluar el efecto del agregado exógeno de Ca sobre la resistencia de la marchitez bacteriana. Para ello, plantas del genotipo susceptible cv. Chieftain y del genotipo parcialmente resistente 09509.6 fueron regadas periódicamente con Ca y luego inoculadas con la bacteria. El tratamiento con Ca mostró un retraso y una reducción significativa del progreso de la enfermedad en el control susceptible y una disminución de los síntomas en el genotipo parcialmente resistente, donde todas las plantas se mantuvieron asintomáticas. Cuando la concentración de Ca fue cuantificada en estas plantas a nivel de hoja, se observó que ambos genotipos mostraron una concentración de Ca mayor luego de la inoculación, independientemente del tratamiento que había recibido (Ca o SF) y se observó que la infección del patógeno puede inducir una mayor absorción de Ca en plantas tratadas con SF en el genotipo parcialmente resistente en comparación con el control susceptible.

Estos resultados se pueden relacionar con estudios realizados en plantas de morrón donde una mayor resistencia a *R. solanacearum* se relacionó con una mayor absorción de Ca por parte de la planta. Además, en este estudio se asociaron los niveles aumentados de Ca con una mayor acumulación de H₂O₂, aumento del intercambio iónico e inducción de la respuesta de hipersensibilidad (Shen et al., 2016). Estos resultados también fueron observados en el genotipo 09509.6 con resistencia parcial evaluado en esta tesis.

Estos resultados son promisorios para continuar investigando el papel del Ca sobre la marchitez bacteriana en la papa y el crecimiento y la virulencia del patógeno en este cultivo. El cultivo en suelos ricos en Ca o el uso de fertilizantes con este mineral son medidas que podrían contribuir al control de la marchitez bacteriana en papa, que a su vez se podría combinar con el uso de variedades parcialmente resistentes y agentes de control biológico para lograr un manejo integrado de la enfermedad. Estas dos últimas estrategias han sido evaluadas y han logrado resultados efectivos en la reducción de la marchitez bacteriana en tomate (Kwak et al., 2018; Subedi et al., 2019).

Este trabajo resalta el potencial de los genotipos con resistencia parcial seleccionados como recurso genético para futuros cruzamientos del programa de mejoramiento y para comprender la resistencia a *R. solanacearum* en papa.

5.2 Conclusiones.

En este trabajo se generaron resultados que permitieron avanzar en el estudio de las interacciones entre *R. solanacearum* y el germoplasma generado en el programa de mejoramiento genético de papa. Se resumen a continuación las principales conclusiones obtenidas a partir de este trabajo:

1. Se desarrollaron metodologías y herramientas para la evaluación de la resistencia a la marchitez bacteriana en germoplasma de papa incluyendo protocolos de inoculación de plantas bajo condiciones controladas, seguimiento y evaluación de síntomas de marchitamiento, detección de infecciones latentes en plantas asintomáticas, y cepas reporteras de *R. solanacearum* con actividad fluorescente o luminiscente aplicables para el seguimiento del patógeno *in planta*.
2. Estas herramientas contribuyeron a seleccionar anualmente los progenitores a utilizar en los sucesivos cruzamientos de un esquema de mejoramiento genético basado en el uso de *S. phureja* como especie puente y retrocruzas sucesivas con *S. tuberosum* para eliminar características silvestres no deseadas. Mediante esta estrategia se lograron seleccionar materiales avanzados con buenos niveles de resistencia a marchitez bacteriana introgresada a partir de *S. commersonii* y con buen potencial de adaptación a condiciones locales de producción.
3. Se encontraron diferencias significativas en los patrones de colonización y las respuestas de defensa desencadenadas por la infección con *R. solanacearum* en genotipos de papa con diferentes niveles de resistencia a la marchitez bacteriana. En los genotipos con resistencia parcial inoculados predominaron plantas asintomáticas en las cuales la colonización alcanzó hasta la base del tallo, con una menor concentración y extensión de tejido afectado en relación con los genotipos susceptibles. En estas plantas la infección con el patógeno desencadenó una serie de modificaciones estructurales, respuestas a nivel bioquímico y patrones diferenciales de expresión de genes de defensa, resultando en la limitación en la multiplicación del patógeno y del progreso de la infección al resto de la planta.
4. Se analizó el perfil de minerales en plantas de papa con respuesta diferencial frente a *R. solanacearum*, encontrando mayores concentraciones de Ca a nivel de tallo y savia xilemática en el genotipo parcialmente resistente. Este mineral tiene un efecto inhibitor del crecimiento de *R. solanacearum* y sobre características asociadas a la virulencia como la formación de *biofilm*, adhesión y la movilidad tipo *twitching*. El agregado exógeno de Ca retrasó y disminuyó la severidad

de síntomas de marchitamiento en plantas susceptibles y resistentes inoculadas con *R. solanacearum*. También se verificó un aumento en las concentraciones de Ca a nivel de hoja asociado a la inoculación con el patógeno principalmente en el genotipo resistente.

5. Se optimizaron las condiciones para el crecimiento de *R. solanacearum* en cámaras de microfluído bajo condiciones de flujo. Este modelo resultó adecuado para evaluar el crecimiento del patógeno y permitió observar diferencias de morfología, movilidad, adhesión y formación de *biofilm* en diferentes condiciones.

5.3 Perspectivas.

Los resultados obtenidos en esta Tesis también revelaron varios aspectos sobre los cuales se podría continuar profundizando en futuros estudios.

El efecto del Ca sobre el crecimiento y la virulencia de *R. solanacearum* es un hallazgo interesante sobre el cual se debería continuar profundizando. En particular, se plantea realizar un análisis transcriptómico de *R. solanacearum* creciendo en presencia de calcio bajo condiciones de flujo para identificar globalmente las vías inducidas o reprimidas en estas condiciones respecto al medio sin suplementar. Relacionado con este tema, también se plantea evaluar el efecto del Mg sobre el crecimiento y actividades asociadas a la virulencia de *R. solanacearum* así como efecto de este mineral sobre el desarrollo de la marchitez bacteriana.

Por otro lado, se propone iniciar estudios dirigidos a la búsqueda y evaluación de agentes de biocontrol que tengan un efecto antagonista frente a *R. solanacearum*. Este componente combinado con otras medidas de control, como el uso de variedades con resistencia parcial, fertilización con Ca y uso de semilla certificada, permitirían implementar una estrategia de manejo integrado de la enfermedad. Para ello, se plantea iniciar estudios a nivel del microbioma asociado a los genotipos de papa con resistencia parcial a la marchitez bacteriana, para intentar identificar si existe alguna asociación entre la estructura de las comunidades rizosféricas o endofíticas y la resistencia a este patógeno.

APÉNDICES

1. Medios de cultivo.

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

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

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

En caso de que se quiera usar el medio phi líquido, el procedimiento de preparado es el mismo pero no se agrega agar ni TTC a la mezcla.

- **Medio Mínimo.**

Solución KH_2PO_4	17,5 ml de solución stock
Solución $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	10 ml de solución stock
Solución $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 ml de solución stock
Solución $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100 μl de solución stock
Agua destilada	1000 ml

Previo a la preparación del medio deben prepararse y autoclavarse las soluciones de las sales detalladas en la tabla. La composición de cada solución se detalla a continuación.

- Solución KH_2PO_4 :

Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	200,0 g
Agua destilada	1000 ml

- Solución $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:

Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50,0 g
Agua destilada	1000 ml

- Solución $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:

Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	10,0 g
Agua destilada	1000 ml

- Solución $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:

Sulfato de magnesio ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,125 g
Agua destilada	100 ml

Preparación: Se realizan las tomas de las soluciones previamente esterilizadas y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. Se homogeneiza bien, se ajusta el pH del medio a 7,0 con hidróxido de potasio (KOH) 1M y se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Se deja termostatar el medio a 45°C y se agrega el correspondiente volumen de la fuente de carbono utilizada para lograr la concentración final indicada (L-glutamato 20mM, 0,2% glucosa, glicerol 2%). Estos componentes se esterilizan previamente por filtración porque pueden cristalizar durante el autoclavado.

- **Medio mSMSA (Elphinstone et al., 1996).**

Peptona	10 g
Casaminoácidos	1 g
Glicerol	5 ml
Agar	18 g

Apéndices

Agua destilada	1000 ml
----------------	---------

Preparación: Se realizan las tomas de cada componente y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. Se homogeneiza bien y se ajusta el pH del medio a 7,0. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C. Se deja enfriar a 45-50°C y se agregan las soluciones que se indican a continuación las cuales fueron previamente esterilizadas por filtración.

Antibiótico	Concentración(%)	Volumen agregado(ml)
Polimixina B sulfato	1	10
Cicloheximida	1	10
Bacitracina A	1	2,5
Penicilina G	0,1	0,5
Cloranfenicol	1	0,5
Cristal violeta	1	0,5
2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC)	1	5

Se reparte

en placas de Petri de a 20 ml aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las placas se secan a temperatura ambiente y se conservan a 4°C hasta su uso.

En caso de que se quiera usar el medio mSMSA líquido, el procedimiento de preparado es el mismo pero no se agrega agar ni TTC a la mezcla.

- **Medio Casaminoácido-peptona-glucosa (CPG).**

Agar	15 g
Peptona	10 g
Glucosa	5 g
Casaminoácidos	1 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Se realizan las tomas en peso de agar, peptona, glucosa y casaminoácidos y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. Se homogeiniza bien y se ajusta el pH del medio a 7,0. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C. El medio completo se reparte asépticamente en placas de Petri de a 20 ml aproximadamente. Luego de solidificado el agar, las placas se secan a temperatura ambiente y se conservan a 4°C hasta su uso.

En caso de que se quiera usar el medio CPG líquido, el procedimiento de preparado es el mismo pero no se agrega agar a la mezcla.

- **Medio papa multiplicación.**

Solución A	20 ml de solución stock
Solución B	20 ml de solución stock
Solución C	20 ml de solución stock
Solución D	20 ml de solución stock
Solución E	20 ml de solución stock
Vitaminas STABA	1 ml de solución stock
Myo-Inositol	200 mg
Sacarosa	30 g
Agar	8 g
Agua destilada	1000 ml

Previo a la preparación del medio deben prepararse y autoclavarse las soluciones A, B, C, D, E y vitaminas STABA. La composición de cada solución se detalla a continuación.

- Solución A: nitratos

Nitrato de potasio (KNO ₃)	95,0 g
Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	82,5 g
Agua destilada	1000 ml

- Solución B: sulfatos

Apéndices

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

- Solución C: Halógenos

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

- Solución D:

Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	8,5 g
Ácido bórico (H_3BO_3)	0,310 g
Molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,0125 g
Agua destilada	1000 ml

- Solución E:

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

- Solución vitaminas STABA:

Ácido fólico	50 mg
Biotina	100 mg
Cloro colina	100 mg
Ácido pantoténico	100 mg

Apéndices

Tiamina	100 mg
Nicotinamida	200 mg
Piridoxina	200 mg
Ácido aminobenzoico	200 mg
Agua destilada	100 ml

Preparación: Se realizan las tomas de las soluciones previamente esterilizadas y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. Se homogeiniza bien y se ajusta el pH del medio a 5,8. Se funde y se reparten 30-50 ml en frascos o tubos de vidrio para la multiplicación de plantas. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

2. Buffers y soluciones.

- **Buffer de extracción fosfato 50 mM pH 7,0 (Anonymous, 2006).**

Na ₂ HPO ₄	4,26 g
KH ₂ PO ₄	2,72 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Se realizan las tomas en peso de cada componente y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. Se ajusta el pH del *buffer* a 7,0. Se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

- **Buffer TBE 0,5X para electroforesis.**

Previo a la preparación de la solución de TBE 0,5X debe prepararse una solución de TBE 10X en agua destilada.

Tris Base	108 g
Ácido bórico	55 g
EDTA	7,5 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Se realizan las tomas en peso de cada componente y se agrega el correspondiente volumen de agua destilada. Se ajusta el pH del *buffer* a 8,3. Luego diluir 50 ml de la solución TBE 10X agregando 950 ml de agua destilada.

- **Solución DAB-HCl (1 mg/ml).**

Previo a la preparación de la solución de DAB-HCl debe prepararse una solución de HCl 0,5 N en agua destilada. El día de la tinción preparar una solución de DAB-HCl 25 mg/ml.

DAB	0,1 g
HCl 0,5 N	4 ml

Luego diluir la solución a 1 mg/ml y ajustar el pH a 3,8.

3. Condiciones optimizadas para la detección de *R. solanacearum* por multiplex-PCR.

Componente	Concentración stock	Volumen agregado (µl)	Concentración de uso
<i>Buffer</i>	10X	2,5	10X
MgCl ₂	50 mM	0,75	1,5 mM
dNTPs	5 mM cada dNTP	1	0,2 mM cada dNTP
00878F	10 µM	1	0,4 µM
00878R	10 µM	1	0,4 µM
759 (<i>primer F</i>)	10 µM	1	0,4 µM
760 (<i>primer R</i>)	10 µM	1	0,4 µM
<i>Taq</i> ADN polimerasa	5 U/µl	0,3	1,5 U
Agua miliQ	-	9,45	-
ADN	lisado	5	-
Volumen total		25	

Gen ID	<i>Primers forward</i>	<i>Primers reverse</i>
RSIPO_00878	00876F: 5'-TAGAGCCACTGCTGCTGAGA-3'	00876R: 5'-GCATATTTTCGCCACCTTCAT-3'
759/760 ^a	759: 5'-GTCGCCGTCAACTCACTTTCC-3'	760: 5'-TCCATTCCCCATCGTCATAG-3'

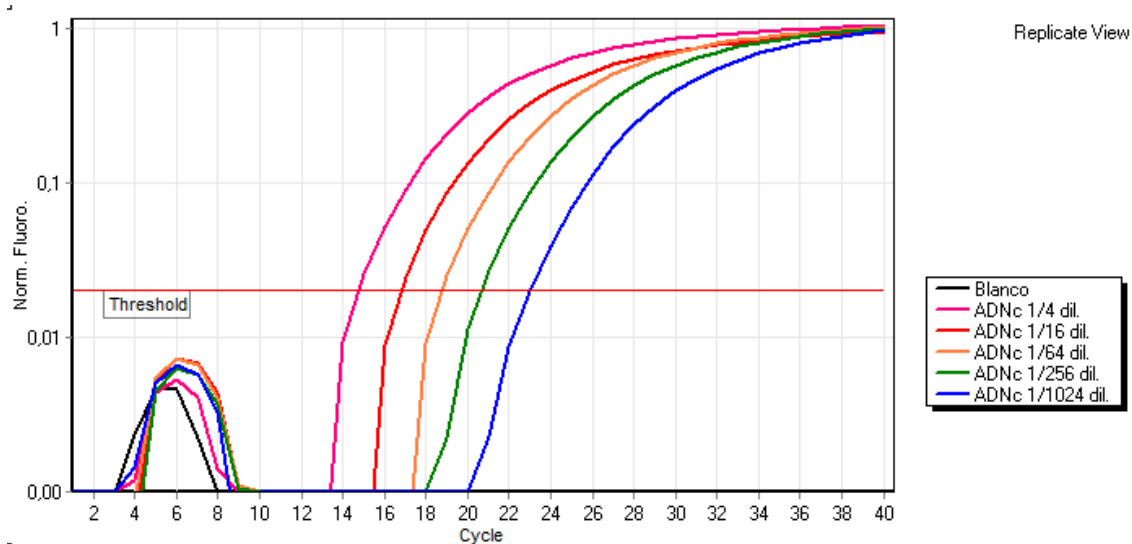
^a: Primers publicados en Opina et al., 1997.

Programa de temperaturas: un primer paso de desnaturalización a 96°C por 5 min; 40 ciclos repetidos de desnaturalización a 94°C por 30seg, hibridación a 60°C por 30seg y extensión a 72°C por 45seg; una etapa final de extensión a 72°C por 10 min.

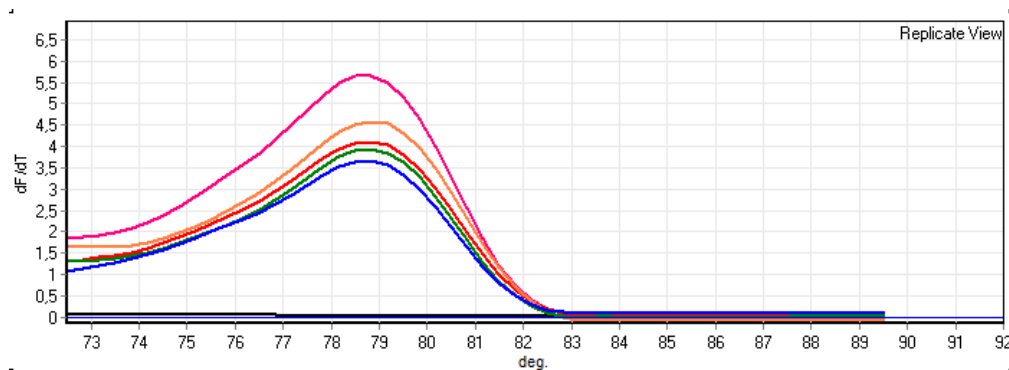
4. Curvas de eficiencia de los genes seleccionados y los genes de referencia.

En las curvas de eficiencia y disociación las réplicas técnicas fueron agrupadas.

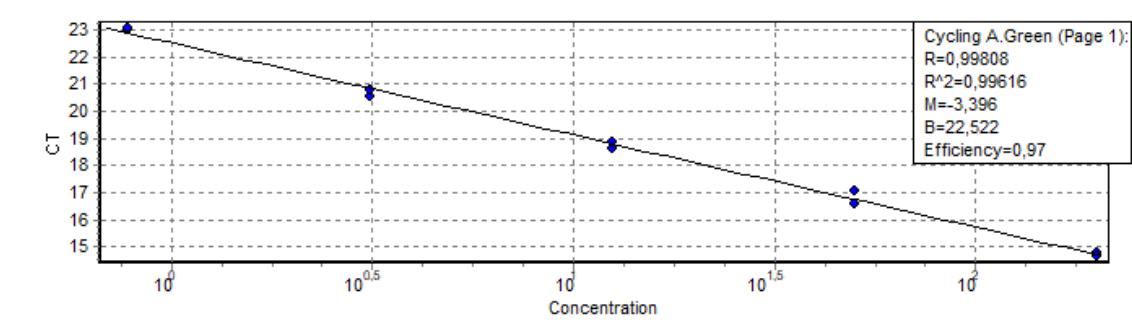
- Curva de eficiencia del gen de referencia Ref_EFg.



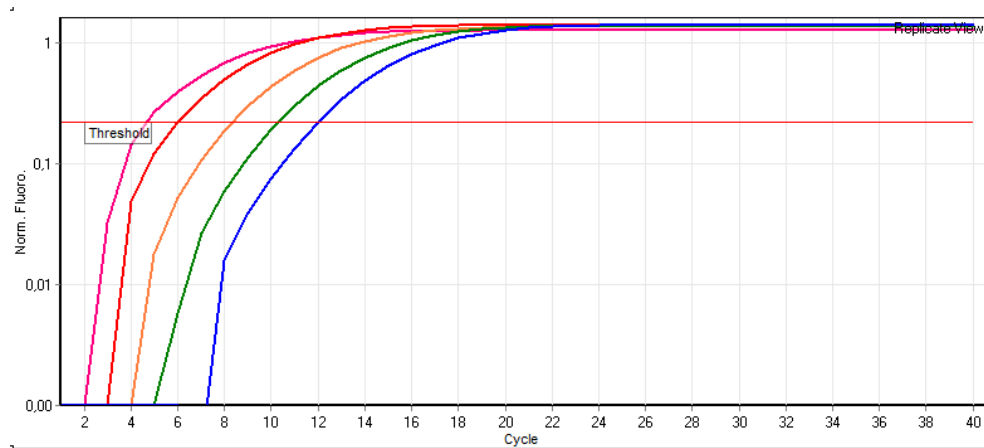
- Curva de disociación de la eficiencia del gen de referencia Ref_EFg.



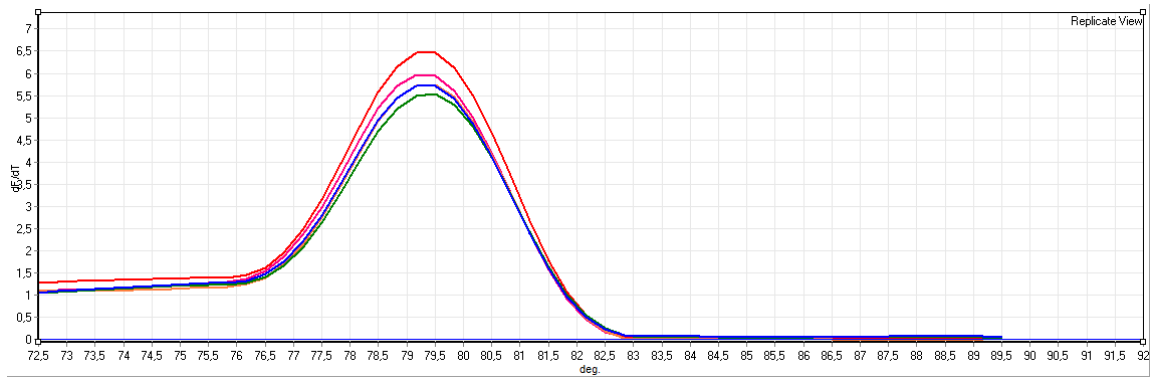
- Linealidad obtenida por las diluciones de la curva de eficiencia del gen de referencia Ref_Efg.



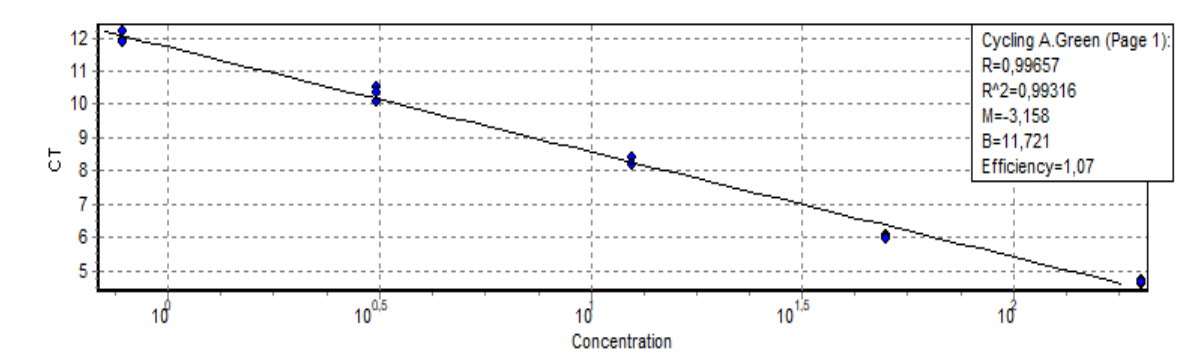
- Curva de eficiencia del gen de referencia β -tubulina.



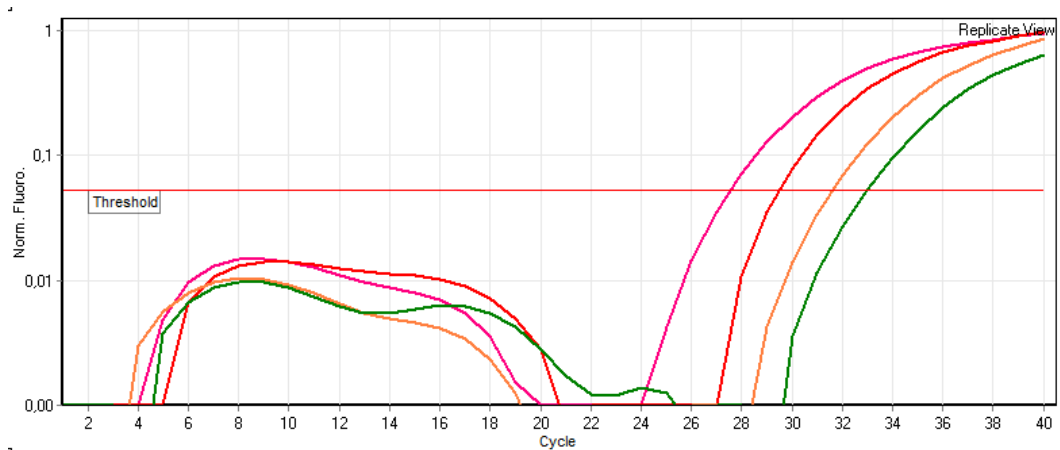
- Curva de disociación de la eficiencia del gen de referencia β -tubulina..



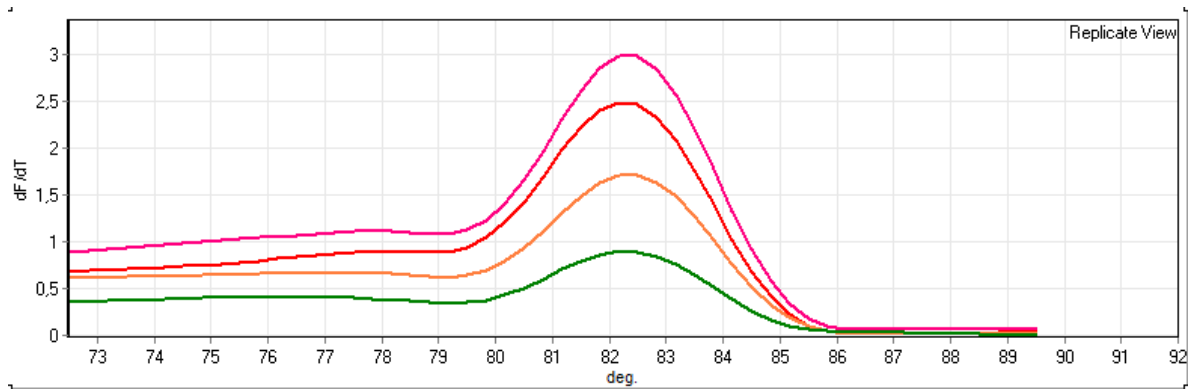
- Linealidad obtenida por las diluciones de la curva de eficiencia del gen de referencia β -tubulina.



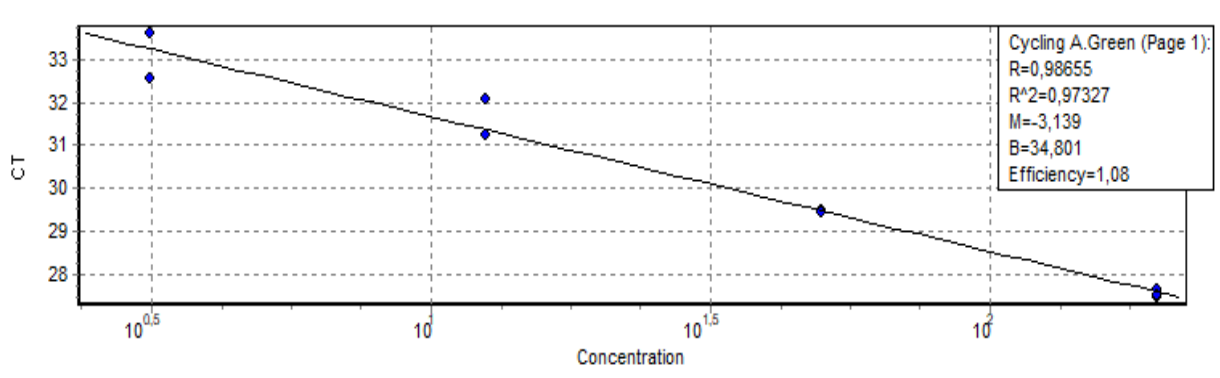
- Curva de eficiencia del gen de referencia ARNr 18S.



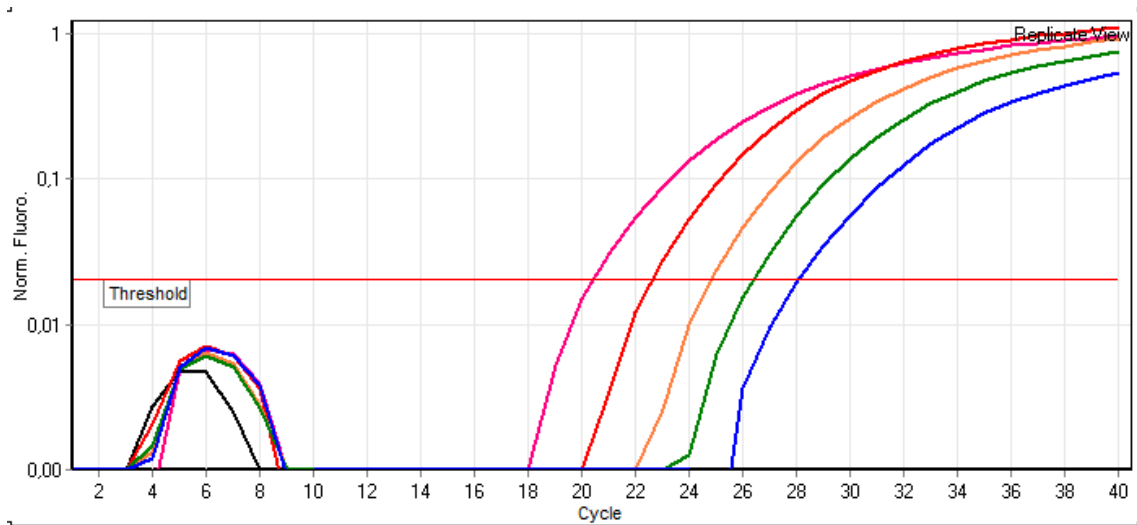
- Curva de disociación de la eficiencia del gen de referencia ARNr 18S.



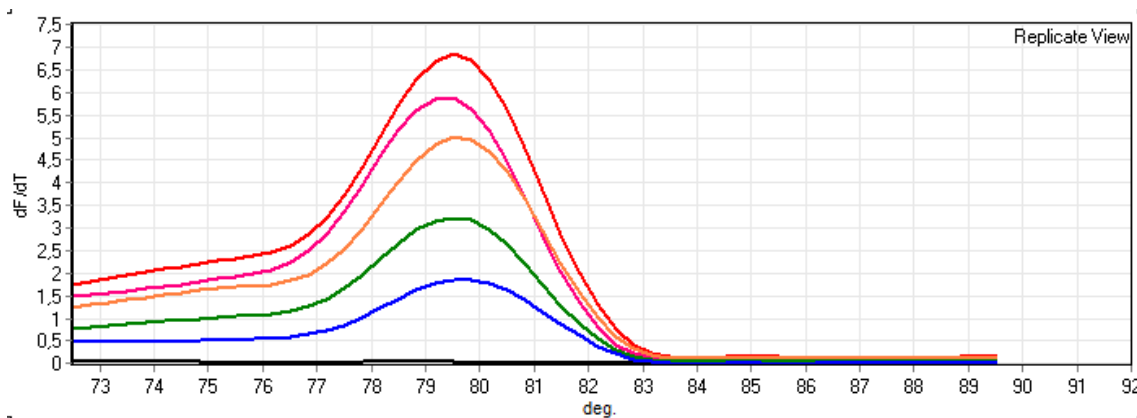
- Linealidad obtenida por las diluciones de la curva de eficiencia del gen de referencia ARNr 18S.



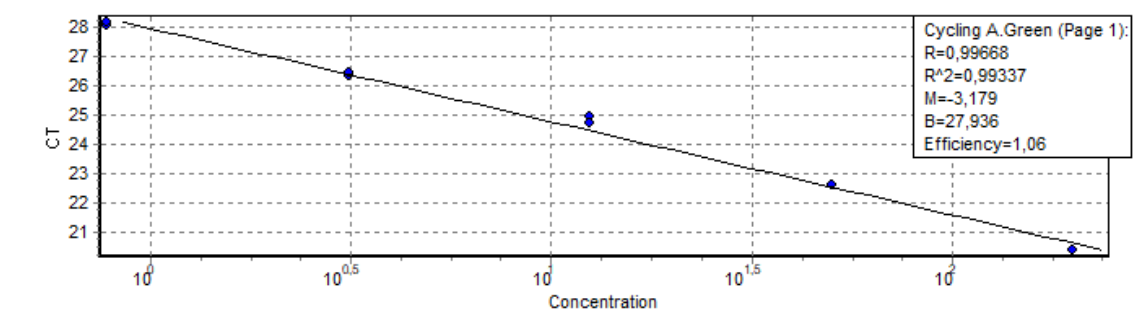
- Curva de eficiencia del gen 1.



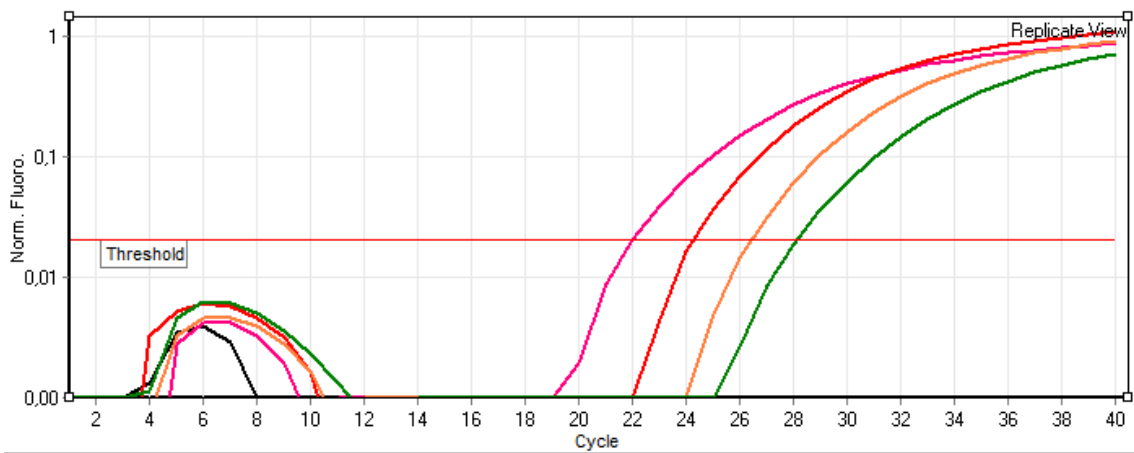
- Curva de disociación de la eficiencia del gen 1.



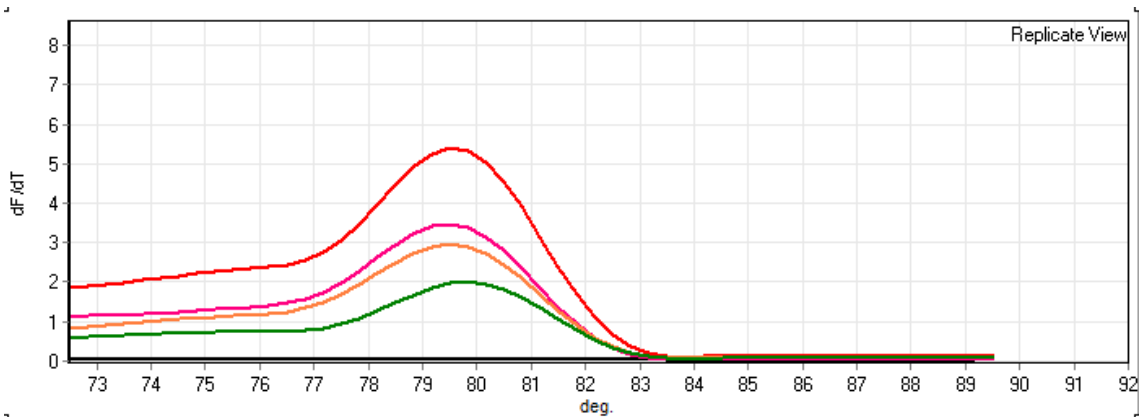
- Linealidad obtenida por las diluciones de la curva de eficiencia del gen 1.



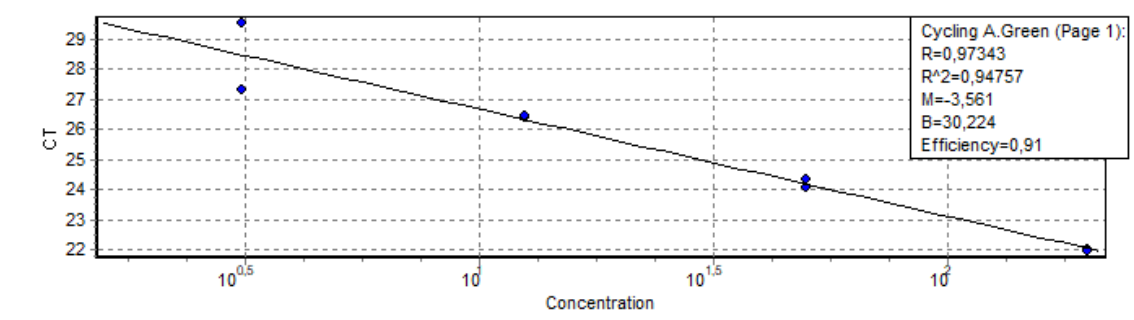
- Curva de eficiencia del gen 2.



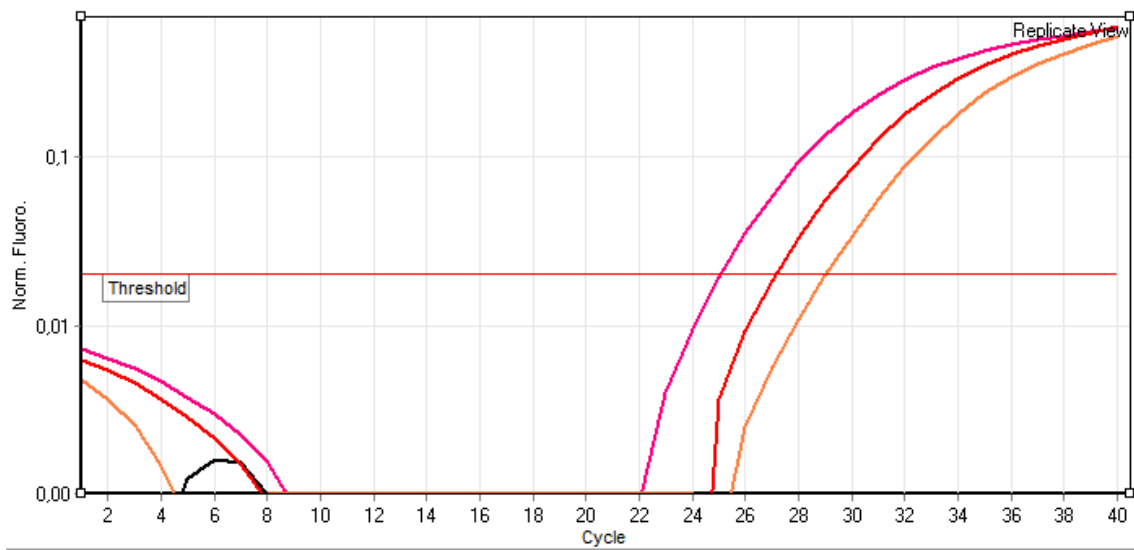
- Curva de disociación de la eficiencia del gen 2.



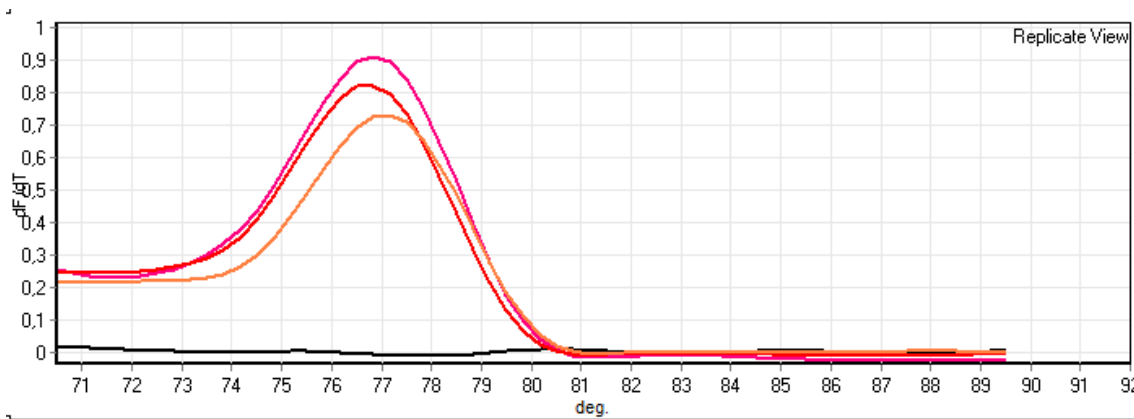
- Linealidad obtenida por las diluciones de la curva de eficiencia del gen 2.



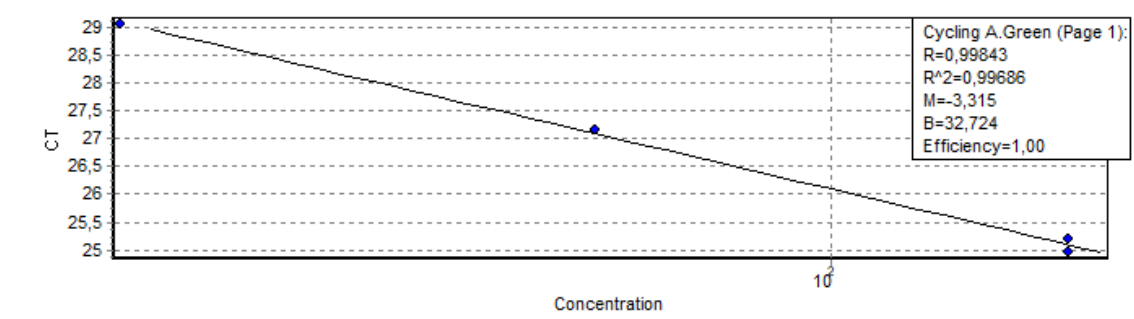
- Curva de eficiencia del gen 3.



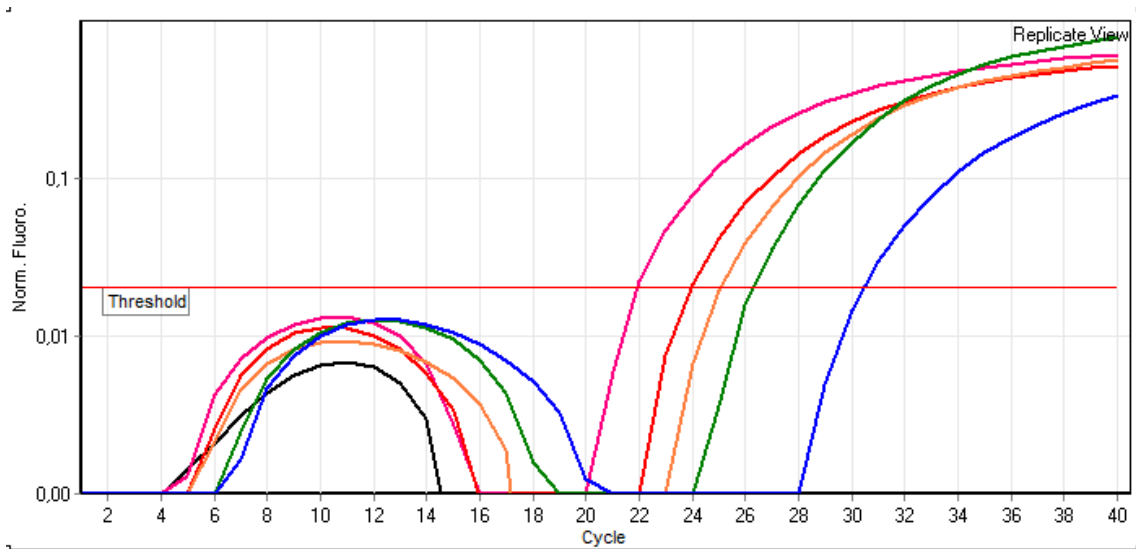
- Curva de disociación de la eficiencia del gen 3.



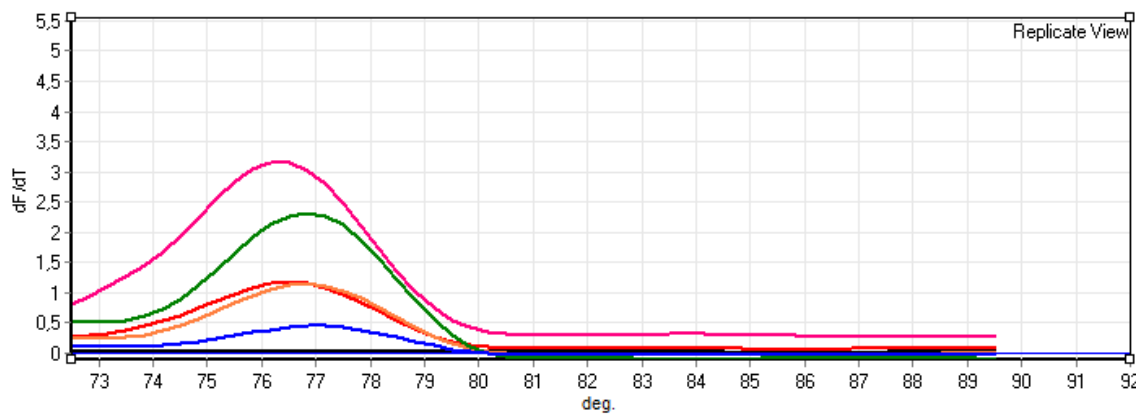
- Linealidad obtenida por las diluciones de la curva de eficiencia del gen 3.



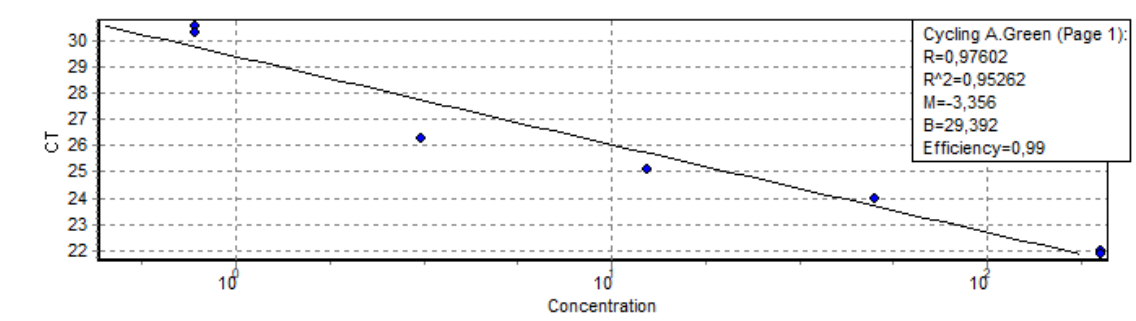
- Curva de eficiencia del gen 5.



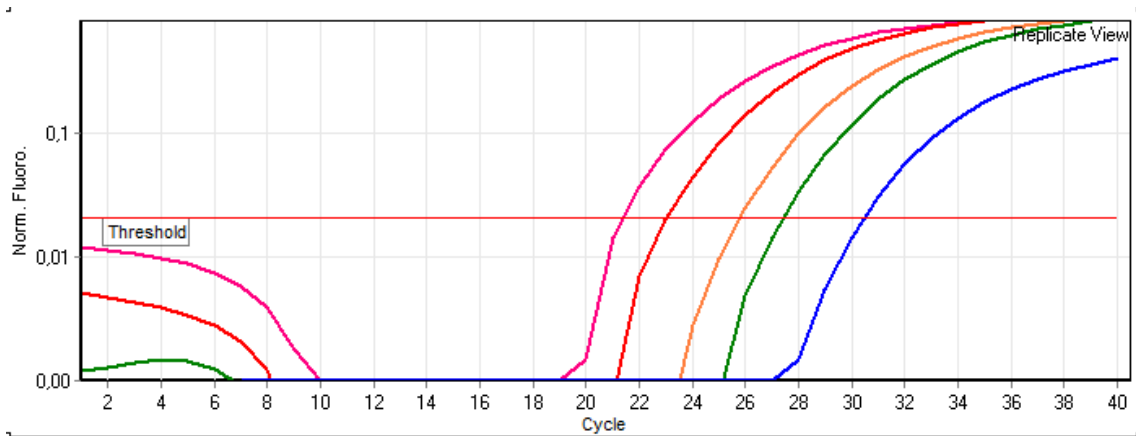
- Curva de disociación de la eficiencia del gen 5.



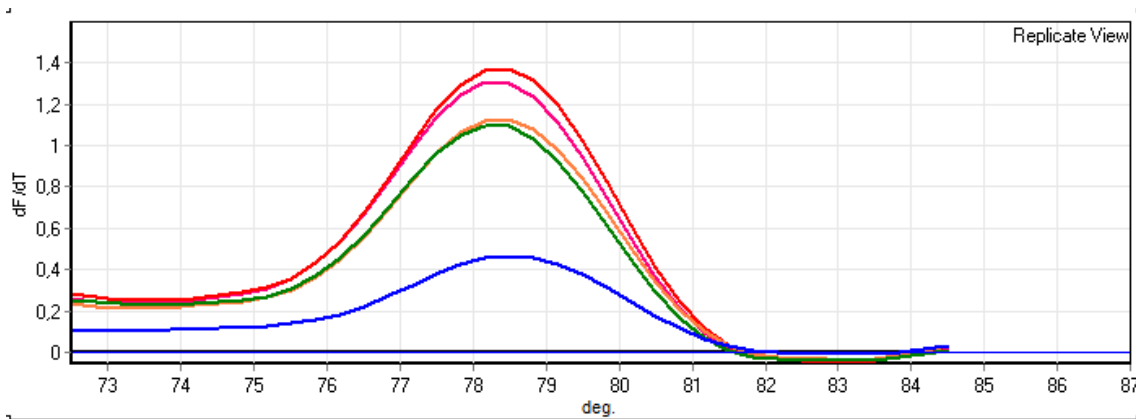
- Linealidad obtenida por las diluciones de la curva de eficiencia del gen 5.



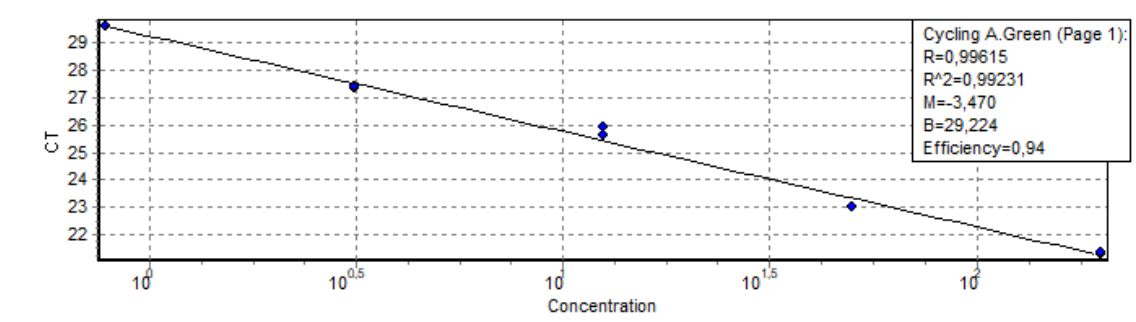
- Curva de eficiencia del gen 6.



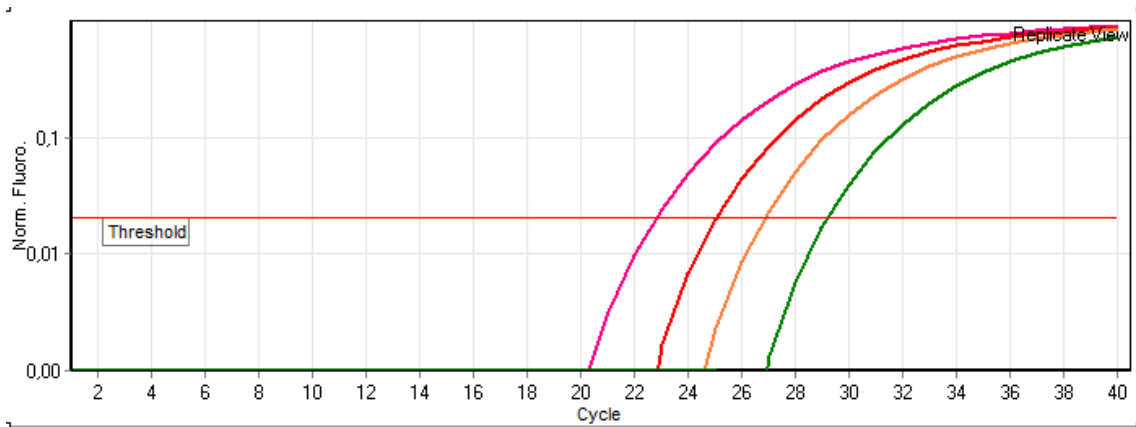
- Curva de disociación de la eficiencia del gen 6.



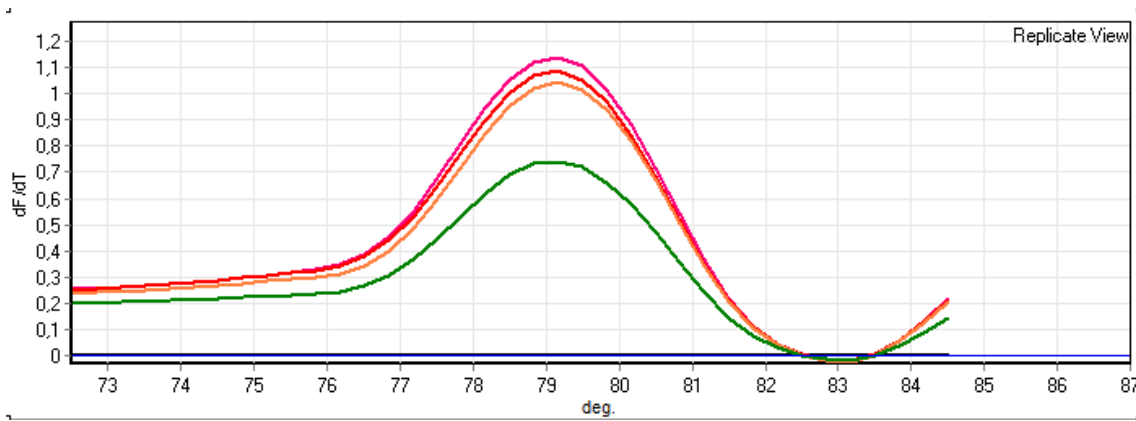
- Linealidad obtenida por las diluciones de la curva de eficiencia del gen 6.



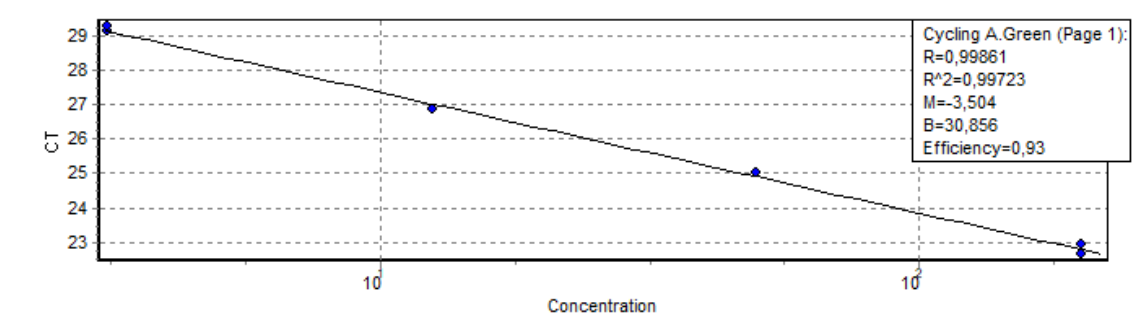
- Curva de eficiencia del gen 9.



- Curva de disociación de la eficiencia del gen 9.



- Linealidad obtenida por las diluciones de la curva de eficiencia del gen 9.



5. Tabla de vectores utilizados en este trabajo.

Vector	Descripción	Referencia
pDSK-GFPuv	Vector utilizado para amplificar el promotor <i>PpsbA</i>	Wang et al. 2007
pG-Pps	pGEM-T-EASY clonado con el promotor <i>PpsbA</i>	Este trabajo
pRCG-GWY	Vector pRC con resistencia a gentamicina utilizado para la integración en el genoma de cepas del filotipo I de <i>R. solanacearum</i> .	Monteiro et al. 2012
pRCG-Pps-GWY	Vector pRC con resistencia a gentamicina conteniendo el promotor <i>PpsbA</i> .	Este trabajo
pRCG-Pep-lux	Vector pRC con resistencia a gentamicina conteniendo fusión reportera <i>Peps::LuxCDABE</i>	Monteiro et al. 2012
pRCG-Pps-lux	Vector pRC con resistencia a gentamicina conteniendo la fusión reportera <i>PpsbA::LuxCDABE</i>	Este trabajo
pG-GFPuv	pGEM-T-EASY clonado con GFPuv	Monteiro et al. 2012
pRCG-Pps-GFP	Vector pRC con resistencia a gentamicina conteniendo la fusión reportera <i>PpsbA::GFPuv</i>	Este trabajo
pRCG-Pep-GFP	Vector pRC con resistencia a gentamicina conteniendo la fusión reportera <i>Peps::GFPuv</i>	Monteiro et al. 2012
pCOMP-PhII	Vector con resistencia a tetraciclina utilizado para integrar regiones homologas a los vectores pRC en las cepas del filotipo II de <i>R. solanacearum</i> .	Monteiro et al. 2012

BIBLIOGRAFÍA

- Abo-Elyousr, K. A., Ibrahim, Y. E., Balabel, N. M. (2012). Induction of Disease Defensive Enzymes in Response to Treatment with acibenzolar-S-methyl (ASM) and *Pseudomonas fluorescens* Pf2 and Inoculation with *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 (phylotype II). *Journal of Phytopathology*, 160(7-8), 382-389.
- Adhikari, T. B., Basnyat, R. C. (1998). Effect of crop rotation and cultivar resistance on bacterial wilt of tomato in Nepal. *Canadian journal of plant pathology*, 20(3), 283-287.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Academic press.
- Aist, J.R. (1976). Papillae and related wound plugs of plant cells. *Annu. Rev. Phytopathology*. 14:145-163.
- Aldon D., Brito B., Boucher C., Genin S. (2000). A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J.*, 19: 2304–2314.
- Aldon, D., Mbengue, M., Mazars, C., Galaud, J. P. (2018). Calcium signalling in plant biotic interactions. *International journal of molecular sciences*, 19(3), 665.
- Allen, C., Kelman, A., French, E. R. (2001). Brown rot of potatoes, Compendium of potato diseases. In: The American Phytopathological Society. W. R. Stevenson, R. Loria, G. D. Franc, D. P. Weingartner, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 11–13
- Alvarez A.M., (2005). Diversity and Diagnosis of *Ralstonia solanacearum*. In Bacterial Wilt: The Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, A.C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Álvarez, B., Biosca, E. G. (2017). Bacteriophage-based bacterial wilt biocontrol for an environmentally sustainable agriculture. *Frontiers in plant science*, 8, 1218.
- 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.
- Álvarez, B., López, M. M., Biosca, E. G. (2008). Survival strategies and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype II subjected to prolonged starvation in environmental water microcosms. *Microbiology*, 154(11), 3590-3598.
- Amano, Y., Tsubouchi, H., Shinohara, H., Ogawa, M., Matsubayashi, Y. (2007). Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(46), 18333-18338.
- Anonymous. (2006). Commission Directive 2006/63/EC of 14 July 2006: amending Annexes II to VII to Council Directive 98/57/EC on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. Off. J. Eur. Communities, L206, 36-106.
- Aoun, N., Tauleigne, L., Lonjon, F., Deslandes, L., Vaillieu, F., Roux, F., Berthomé, R. (2017). Quantitative disease resistance under elevated temperature: genetic basis of new resistance mechanisms to *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in plant science*, 8, 1387.
- Asaro, A., Ziegler, G., Ziyomo, C., Hoekenga, O. A., Dilkes, B. P., Baxter, I. (2016). The interaction of genotype and environment determines variation in the maize kernel ionome. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 6(12), 4175-4183.
- 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.
- Aversano, R., Contaldi, F., Ercolano, M. R., Grosso, V., Iorizzo, M., Tatino, F., Xumerle, L., Dal Molin, A., Avanzato, C., Ferrarini, A., Delledonne, M., Sanseverino, W., Aiese, R., Capella-Gutierrez, S.,

- Gabaldón, T., Frusciante, L., Bradeen, J., Carputo, D. (2015). The *Solanum commersonii* genome sequence provides insights into adaptation to stress conditions and genome evolution of wild potato relatives. *The Plant Cell*, 27(4), 954-968.
- Ayana, G., Fininsa, C., Ahmed, S., Wydra, K. (2011). Effects of soil amendment on bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and tomato yields in Ethiopia. *Journal of plant protection research*, 51(1), 72-76.
- Bach-Pages, M., Preston, G. M. (2018). Methods to quantify biotic-induced stress in plants. In: *Host-Pathogen Interactions*. Humana Press, New York, NY, 241-255.
- Bae, C., Han, S.W., Song, Y.R., Kim, B.Y., Lee, H.J., Lee, J.M. et al. (2015). Infection processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops. *Theor Appl Genet*. 128:1219-1229.
- Bain, R. A., Millard, P., Perombelon, M. C. M. (1996). The resistance of potato plants to *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in relation to their calcium and magnesium content. *Potato Research*, 39(1), 185-193.
- Barretti, P. B., de Souza, R. M., Pozza, E. A., de Souza, J. T. (2012). Combination of endophytic bacteria and resistant cultivars improves control of *Ralstonia* wilt of tomato. *Australasian Plant Pathology*, 41(2), 189-195.
- Baxter, I. R., Ziegler, G., Lahner, B., Mickelbart, M. V., Foley, R., Danku, J., Armstrong, P., Salt, D., Hoekenga, O. A. (2014). Single-kernel ionic profiles are highly heritable indicators of genetic and environmental influences on elemental accumulation in maize grain (*Zea mays*). *PLOS one*, 9(1), e87628.
- Bellincampi, D., Cervone, F., Lionetti, V. (2014). Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant-pathogen interactions. *Front. Plant Sci*. 5:228-235.
- Ben, C., Debellé, F., Berges, H., Bellec, A., Jardinaud, M. F., Anson, P., Huguet, T., Gentzbittel, L., Vaillau, F. (2013). Mt QRRS 1, an R-locus required for *Medicago truncatula* quantitative resistance to *Ralstonia solanacearum*. *New phytologist*, 199(3), 758-772.
- Bilski, J. J., Nelson, D., Conlon, R. L. (1988). The response of four potato cultivars to chloride salinity, sulfate salinity and calcium in pot experiments. *American Potato Journal*, 65(2), 85-90.
- Bittner, R. J., Arellano, C., Mila, A. L. (2016). Effect of temperature and resistance of tobacco cultivars to the progression of bacterial wilt, caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant and soil*, 408(1-2), 299-310.
- Boller, T., Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology*, 60, 379-406.
- Boschi, F., Schwartzman, C., Murchio, S., Ferreira, V., Siri, M. I., Galván, G. A., Smoker, A., Stransfeld, L., Zipfel, C., Vilaró, F., Dalla-Rizza, M. (2017). Enhanced bacterial wilt resistance in potato through expression of *Arabidopsis* EFR and introgression of quantitative resistance from *Solanum commersonii*. *Frontiers in plant science*, 8, 1642.
- Boshou L. (2005). A broad review and perspective on breeding for resistance to bacterial wilt. In: *Bacterial Wilt: The Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. C. Allen, P. Prior, A.C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 225-238.
- Boucher, C. A., Barberis, P. A., Trigalet, A. P., and Demery, D. A. (1985). Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: Isolation of Tn5-induced avirulent mutants. *J. Gen. Microbiol.* 131:2449-2457.
- Bradeen, J. M., Haynes, K. G., Kole, C. (2011). Introduction to potato. In: *Genetics, Genomics and Breeding of Potatoes*. J.M. Bradeen, K.G. Haynes, eds. Sci. Publ., Enfield, NH, 1-19.

- Brencic, A., Winans, S. C. (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69(1), 155-194.
- Brown, C. R., Haynes, K. G., Moore, M., Pavek, M. J., Hane, D. C., Love, S. L., Novy, J. Miller, J. C. (2012). Stability and broad-sense heritability of mineral content in potato: calcium and magnesium. *American journal of potato research*, 89(4), 255-261.
- Brown, I., Trethowan, J., Kerry, M., Mansfield, J.W., Bolwell, G.P. (1998). Location of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *Plant J.* 15:333–343.
- Buddenhagen I.W., Sequeira L. and Kelman A. (1962). Designation of races of *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*. 52: 726.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M., Shipley, G., Vandesompele, J, Wittwer C. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611-622.
- Caldwell, D., Kim, B.S., Iyer-Pascuzzi, A.S. (2017). *Ralstonia solanacearum* differentially colonizes roots of resistant and susceptible tomato plants. *Phytopathology*. 107:528-536.
- Camejo, D., Guzman-Cedeno, A., Moreno, A. (2016). Reactive oxygen species, essential molecules, during plant–pathogen interactions. *Plant Physiology and Biochemistry*, 103, 10-23.
- Cardoso, S. C., Soares, A. C. F., Brito, A. D. S., Laranjeira, F. F., Ledo, C. A. S., Santos, A. P. D. (2006). Control of tomato bacterial wilt through the incorporation of aerial part of pigeon pea and crotalaria to soil. *Summa Phytopathologica*, 32(1), 27-33.
- Carmeille, A., Caranta, C., Dintinger, J., Prior, P., Luisetti, J., and Besse, P. (2006). Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phylo- type II resistance in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 113:110-121.
- Carputo, D., Aversano, R., Barone, A., Di Matteo, A., Iorizzo, M., Sigillo, L., Zoina, A., and Frusciante, L. (2009). Resistance to *Ralstonia solanacearum* of sexual hybrids between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. *Am. J. Potato Res.* 86:196-202.
- Carputo, D., Barone, A., Cardi, T., Sebastiano, A., Frusciante, L., Peloquin, S. J. (1997). Endosperm balance number manipulation for direct in vivo germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(22), 12013-12017.
- Cellier, G., Prior, P. (2010). Deciphering phenotypic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains pathogenic to potato. *Phytopathology*, 100(11), 1250-1261.
- Cerboneschi, M., Decorosi, F., Biancalani, C., Ortenzi, M. V., Macconi, S., Giovannetti, L., Viti, C., Campanella, B., Onor, M., Bramanti, E., Tegli, S. (2016). Indole-3-acetic acid in plant–pathogen interactions: a key molecule for in planta bacterial virulence and fitness. *Research in microbiology*, 167(9-10), 774-787.
- Chai, H. B., Doke, N. (1987). Activation of the potential of potato leaf tissue to react hypersensitively to *Phytophthora infestans* by cytospor germination fluid and the enhancement of this potential by calcium ions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 30(1), 27-37.
- Chaparro, J. M., Holm, D. G., Broeckling, C. D., Prenni, J. E., Heuberger, A. L. (2018). Metabolomics and ionomics of potato tuber reveals an influence of cultivar and market class on human nutrients and bioactive compounds. *Frontiers in nutrition*, 5, 36.

- Chen, L., Guo, X., Xie, C., He, L., Cai, X., Tian, L., Song, B., Liu, J. (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.
- Chisholm, S. T., Coaker, G., Day, B., Staskawicz, B. J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), 803-814.
- Ciampi L., Sequeira L. and French E.R. (1980). Latent infection of potato tubers by *Pseudomonas solanacearum*. *Am. Potato J.* 57:377-386.
- CIP (Centro Internacional de la Papa) (2019a). Especies de papas nativas. [En línea]. [Consulta: 8 de agosto de 2019] Disponible en: <https://cipotato.org/es/potato/wild-potato-species/>
- CIP (Centro Internacional de la Papa) (2019b). Como crecen las papas. [En línea]. [Consulta: 8 de agosto de 2019] Disponible en: <https://cipotato.org/es/potato/how-potato-grows/>
- CIP (Centro Internacional de la Papa) (2019c). Plagas y enfermedades de la papa. [En línea]. [Consulta: 8 de agosto de 2019] Disponible en: <https://cipotato.org/es/potato/potato-pests-diseases/>
- CMBL (Celular and Molecular Biomechanics Laboratory). (2019). Photolithography. [En línea]. [Consulta: 20 de junio de 2019] Disponible en: <http://biomechanicalregulation-lab.org/photolithography>
- Cogan, N. G., Donahue, M. R., Whidden, M., De La Fuente, L. (2013). Pattern formation exhibited by biofilm formation within microfluidic chambers. *Biophysical journal*, 104(9), 1867-1874.
- Coll, N. S., Valls, M. (2013). Current knowledge on the *Ralstonia solanacearum* type III secretion system. *Microbial biotechnology*, 6(6), 614-620.
- Cornelis, G. R., Van Gijsegem, F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 735-774.
- Cruz A.P.Z., Ferreira V., Pianzola M.J., Siri. M.I., Coll N., Valls M. (2014). A novel, sensitive method to evaluate potato germplasm for bacterial wilt resistance using a luminescent *Ralstonia solanacearum* reporter strain. *Mol. Plant Microbe Interact.* 27:277-285.
- Czajkowski, R., Perombelon, M. C., van Veen, J. A., van der Wolf, J. M. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant pathology*, 60(6), 999-1013.
- Daurelio, L.D., Tondo, M.L., Dunger, G., Gottig, N., Ottado, J., Orellano, E. (2009) Hypersensitive response. In: Plant Bioassays. S.S. Narwal, A.N. Catala'n, D.A. Sampietro, M.A. Vattuone, B. Polyticka, eds. Studium Press, Houston, TX, 87–206.
- De La Fuente, L., Montanes, E., Meng, Y., Li, Y., Burr, T. J., Hoch, H. C., Wu, M. (2007). Assessing adhesion forces of type I and type IV pili of *Xylella fastidiosa* bacteria by use of a microfluidic flow chamber. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(8), 2690-2696.
- De Micco, V., Balzano, A., Wheeler, E. A., Baas, P. (2016). Tyloses and gums: a review of structure, function and occurrence of vessel occlusions. *IAWA journal*, 37(2), 186-205.
- Denny T. (2005). A short history of biochemical and genetic research on *Ralstonia solanacearum* pathogenesis. In: Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Allen C., Prior P., Hayward A.C., eds. APS Press, St. Paul, MN, 323-334.
- Denny, T. (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: Plant-Associated Bacteria. S.S. Gnanamanickam, eds. Springer, Dor- drecht, The Netherlands, 573-644.
- Deslandes, L., Genin, S. (2014). Opening the *Ralstonia solanacearum* type III effector tool box: insights into host cell subversion mechanisms. *Current opinion in plant biology*, 20, 110-117.

- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., Marco, Y. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 8024-8029.
- Devaux, A., Kromann, P., Ortiz, O. (2014). Potatoes for sustainable global food security. *Potato Research*, 57(3-4), 185-199.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. (2009). InfoStat 2009 version. InfoStat Group, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- DIEA-MGAP. (2003). Caracterización de la producción de papa: Encuesta 2003. [En línea]. [Consulta: 10 de agosto de 2019] Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politicas-agropecuarias/estadisticas/produccion-vegetal/papa>
- DIEA-MGAP. (2018). Anuario Estadístico Agropecuario. [En línea]. [Consulta: 10 de agosto de 2019] Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/oficina-de-programacion-y-politica-agropecuaria/estadisticas-y-documentos/29-08>
- Digonnet, C., Martinez, Y., Denancé, N., Chasseray, M., Dabos, P., Ranocha, P., Marco, Y., Jauneau, A., Goffner, D. (2012). Deciphering the route of *Ralstonia solanacearum* colonization in *Arabidopsis thaliana* roots during a compatible interaction: focus at the plant cell wall. *Planta*, 236(5), 1419-1431.
- Dorak, M. T. (Ed.). (2007). *Real-time PCR*. Taylor Francis.
- Du, H., Chen, B., Zhang, X., Zhang, F., Miller, S. A., Rajashekara, G., Xu, X., Geng, S. (2017). Evaluation of *Ralstonia solanacearum* infection dynamics in resistant and susceptible pepper lines using bioluminescence imaging. *Plant disease*, 101(2), 272-278.
- Dyson, P. W., Digby, J. (1975). Effects of calcium on sprout growth and sub-apical necrosis in Majestic potatoes. *Potato Research*, 18(2), 290-305.
- EFSA (European Food Safety Authority), van der Gaag, D. J., Camilleri, M., Diakaki, M., Schenk, M., Vos, S. (2019). Pest survey card on potato brown rot, *Ralstonia solanacearum*. *EFSA Supporting Publications*, 16(2), 1567E.
- Elhalag, K., Nasr-Eldin, M., Hussien, A., Ahmad, A. (2018). Potential use of soilborne lytic Podoviridae phage as a biocontrol agent against *Ralstonia solanacearum*. *Journal of basic microbiology*, 58(8), 658-669.
- Elphinstone J.G. (2005). The current bacterial wilt situation: a global overview. In: Bacterial Wilt: The Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, A.C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 9-28.
- 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., Stanford H.M., and Stead D.E. (1998). Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers, *Solanum dulcamara*, and associated irrigation water. In: Bacterial wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects. P. Prior, C. Allen, J. Elphinstone, eds. Springer-Verlag, Berlin. 133-139.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2018a. EPPO Global Database. [En línea]. [Consulta: 15 de junio de 2019] Disponible en: <https://gd.eppo.int>
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization), 2018b. PM 7/21 (2) *Ralstonia solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* and *R. syzygii* (*Ralstonia solanacearum* species complex). *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 48, 32-63.

- Fegan, M., Prior, P. (2005). "How complex is the *Ralstonia solanacearum* Species Complex?". In: Bacterial Wilt: The Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior A.C. Hayward, eds. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, 449-461.
- 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. 77 pág.
- Ferreira, V., Pianzola, M. J., Vilaró, F. L., Galván, G. A., Tondo, M. L., Rodríguez, M. V., Orellano, E., Valls, M., Siri, M. I. (2017). Interspecific potato breeding lines display differential colonization patterns and induced defense responses after *Ralstonia solanacearum* infection. *Frontiers in plant science*, 8, 1424.
- Filinova, N. V., Lomovatskaya, L. A., Romanenko, A. S., Salyaev, R. K. (2018). Calcium as a Modulator of the Adenylyl Cyclase Activity of Potato Cells in Bacterial Pathogenesis. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 483(1), 379-381.
- Fock, I., Collonnier, C., Purwito, A., Luisetti, J., Souvannavong, V., Vedel, F., Servaes, A., Ambroise, A., Kodja, H., Ducreux G., Sihachakr, D. (2000). Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Science*, 160(1), 165-176.
- Fortnum, B. A., Martin, S. B. (1998). Disease management strategies for control of bacterial wilt of tobacco in the southeastern USA. In: Bacterial wilt disease. P. Prior, C. Allen, J. Elphinstone, eds. Springer, Berlin, Heidelberg, 394-402.
- French, E. R., and De Lindo., L. (1982). Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato. Specificity and temperature sensitivity. *Phytopathology*, 72:1408-1412.
- French, E., Kim, B. S., Iyer-Pascuzzi, A. S. (2016). Mechanisms of quantitative disease resistance in plants. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press. 56, 201-208.
- Fujie, M., Takamoto, H., Kawasaki, T., Fujiwara, A., Yamada, T. (2010). Monitoring growth and movement of *Ralstonia solanacearum* cells harboring plasmid pRSS12 derived from bacteriophage ϕ RSS1. *Journal of bioscience and bioengineering*, 109(2), 153-158.
- 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* \times *S. tuberosum* (potato) interspecific hybrids. *Euphytica*. 213:137-151.
- Galván G., Franco Fraguas L., Quirici L., Santos C., Silvera E., Siri M.I., Villanueva P., Raudiviniche L., González M., Torres D., Castillo A., Dalla Rizza M., Vilaró F., Gepp V., Ferreira F y Pianzola M.J. (2007). *Solanum commersonii*: una especie con gran potencial para el mejoramiento genético de papa por resistencia a *Ralstonia solanacearum*. En: Avances de Investigación en Recursos Genéticos del Cono Sur II. A. Clausen., F. Condón, A. Berreta, eds. PROCISUR – IICA. Montevideo. 87-101.
- Gao, X., Cox Jr, K., He, P. (2014). Functions of calcium-dependent protein kinases in plant innate immunity. *Plants*, 3(1), 160-176.
- García, R. O., Kerns, J. P., Thiessen, L. (2019). *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Quick Diagnostic Guide. *Plant Health Progress*, 20(1), 7-13.
- GenBank (2019). Genome [*Ralstonia solanacearum*]. [En línea]. [Consulta: 10 de agosto de 2019] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/490?>
- Genin S., (2010). Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. *New Phytologist*, 187(4): 980-8.
- Genin, S., Denny, T.P. (2012). Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu. Rev. Phytopathology*. 50:67-89.

- Godiard, L., Sauviac, L., Torii, K. U., Grenon, O., Mangin, B., Grimsley, N. H., Marco, Y. (2003). ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *The Plant Journal*, 36(3), 353-365.
- González-Lamothe, R., El Oirdi, M., Brisson, N., Bouarab, K. (2012). The conjugated auxin indole-3-acetic acid–aspartic acid promotes plant disease development. *The Plant Cell*, 24(2), 762-777.
- González, M. (2010). Análisis de la resistencia a *Ralstonia solanacearum* en una progenie segregante de *Solanum commersonii*. Tesis de Maestría, Universidad de la República, Uruguay.
- Gonzalez, M., Galvan, G., Siri, M. I., Borges, A., and Vilaro, F. (2013). Resistencia a la marchitez bacteriana de la papa en *Solanum commersonii* Dun. *Agrociencia* 17:45-54.
- Grimault, V., Anais, G. and Prior, P. (1994a). Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. *Plant Pathol.* 43:663-668.
- Grimault, V., Gélie, B., Lemattre, M., Prior, P., Schmit, J. (1994b). Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44:105-123.
- Grimault, V., Prior, P. (1993). Bacterial wilt resistance in tomato associated with tolerance of vascular tissues to *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Pathol.* 42:589-594.
- Gu, Y., Hou, Y., Huang, D., Hao, Z., Wang, X., Wei, Z., Jousset, A., Tan, S., Xu, D., Shen, Q., Xu, Y., Friman, V. (2017). Application of biochar reduces *Ralstonia solanacearum* infection via effects on pathogen chemotaxis, swarming motility, and root exudate adsorption. *Plant and soil*, 415(1-2), 269-281.
- Guarisch-Sousa, R., Puigvert, M., Coll, N. S., Siri, M. I., Pianzzola, M. J., Valls, M., et al. (2016). Complete genome sequence of the potato pathogen *Ralstonia solanacearum* UY031. *Stand. Genomic Sci.* 11:7-14.
- Guidot A., Elbaz M., Siri M.I., Pianzzola M.J., Prior P. and C. Boucher. (2009). Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* (phylotype IIB, sequevar 1 historically known as race 3, biovar 2 strains) and their potential use for strain detection. *Phytopathology*, 99(9): 1105-1112.
- Gutarra, L., Herrera, J., Fernandez, E., Kreuze, J., Lindqvist-Kreuze, H. (2017). Diversity, pathogenicity, and current occurrence of bacterial wilt bacterium *Ralstonia solanacearum* in Peru. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1221.
- Gutarra, L., Kreuze, J., Lindqvist-Kreuze, H., De Mendiburu, F. (2015). Variation of resistance to different strains of *Ralstonia solanacearum* in highland tropics adapted potato genotypes. *American Journal of Potato Research*, 92(2), 258-265.
- Hacisalihoglu, G., Ji, P., Longo, L. M., Olson, S., Momol, T. M. (2007). Bacterial wilt induced changes in nutrient distribution and biomass and the effect of acibenzolar-S-methyl on bacterial wilt in tomato. *Crop Protection*, 26(7), 978-982.
- Hadfield, K, Bennett, A. (1998). *Plant Physiology*, 117 (2) 337-343.
- Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8(10), 1773.
- Hassan, M. A., Abo-Elyousr, K. A. (2013). Activation of tomato plant defence responses against bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* using DL-3-aminobutyric acid (BABA). *European Journal of Plant Pathology*, 136(1), 145-157.
- Hayward A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *J. Appl. Bacteriol.* 27:265-277.

- Hayward A.C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29: 65-89.
- He, K., Yang, S. Y., Li, H., Wang, H., Li, Z. L. (2014). Effects of calcium carbonate on the survival of *Ralstonia solanacearum* in soil and control of tobacco bacterial wilt. *European journal of plant pathology*, 140(4), 665-675.
- Hikichi, Y., Mori, Y., Ishikawa, S., Hayashi, K., Ohnishi, K., Kiba, A., Kai, K. (2017). Regulation involved in colonization of intercellular spaces of host plants in *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in plant science*, 8, 967.
- Hikichi, Y., Nakazawa-Nasu, Y., Kitanosono, S., Suzuki, K., and Okuno, T. (1999). The behavior of *lux*-marked *Ralstonia solanacearum* in grafted tomato cultivars resistant or susceptible to bacterial wilt. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 65:597-603.
- Hong, J. C., Norman, D. J., Reed, D. L., Momol, M. T., Jones, J. B. (2012). Diversity among *Ralstonia solanacearum* strains isolated from the southeastern United States. *Phytopathology*, 102(10), 924-936.
- Hood, M. I., Skaar, E. P. (2012). Nutritional immunity: transition metals at the pathogen–host interface. *Nature Reviews Microbiology*, 10(8), 525.
- Huamán, Z., Spooner, D. M. (2002). Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* sect. *Petota*). *American Journal of Botany*, 89(6), 947-965.
- Huet, G. (2014). Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. *Front. Plant. Sci.* 715:1-5.
- Igarashi, D., Tsuda, K., Katagiri, F. (2012). The peptide growth factor, phyto­sulfokine, attenuates pattern-triggered immunity. *The plant journal*, 71(2), 194-204.
- Ishihara, T., Mitsu­hara, I., Takahashi, H., Nakaho, K. (2012). Transcriptome analysis of quantitative resistance-specific response upon *Ralstonia solanacearum* infection in tomato. *PLoS One*, 7(10), e46763.
- Janse J.D. (1996). Potato brown rot in western Europe: History, present, occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. *EPPO Bull.*, 26:679-695.
- Jiang, J. F., Li, J. G., Dong, Y. H. (2013). Effect of calcium nutrition on resistance of tomato against bacterial wilt induced by *Ralstonia solanacearum*. *European journal of plant pathology*, 136(3), 547-555.
- Jiang, N., Fan, X., Lin, W., Wang, G., Cai, K. (2019). Transcriptome Analysis Reveals New Insights into the Bacterial Wilt Resistance Mechanism Mediated by Silicon in Tomato. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 761.
- Jiang, Y., Huang, M., Zhang, M., Lan, J., Wang, W., Tao, X., Liu, Y. (2018). Transcriptome analysis provides novel insights into high-soil-moisture-elevated susceptibility to *Ralstonia solanacearum* infection in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe cv. Southwest). *Plant Physiology and Biochemistry*, 132, 547-556.
- Johansen, D.A. (1940). *Plant microtechnique*. London: McGraw-Hill Book Company.
- Johnston, S. A., Den Nijs, T. P. M., Peloquin, S. J., Hanneman, R. E. (1980). The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theoretical and applied genetics*, 57(1), 5-9.
- Jones, J. D., Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323.
- Kang, Y., Liu, H., Genin, S., Schell, M. A., Denny, T. P. (2002). *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Molecular microbiology*, 46(2), 427-437.

- Karley, A. J., White, P. J. (2009). Moving cationic minerals to edible tissues: potassium, magnesium, calcium. *Current opinion in plant biology*, 12(3), 291-298.
- Katafiire, M., E. Adipala, B. Lemaga, M. Olanya, and R. El-bedewy. (2005). Management of bacterial wilt of potato using one-season rotation crops in southwestern Uganda. In C. Allen, P. Prior and A.C. Hayward (ed.), *Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN. p. 197–204.
- Kawasaki, T., Satsuma, H., Fujie, M., Usami, S., Yamada, T. (2007). Monitoring of phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* cells using green fluorescent protein-expressing plasmid derived from bacteriophage ϕ RSS1. *Journal of bioscience and bioengineering*, 104(6), 451-456.
- Kelman A. (1954). The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. *Phytopathology*. 44, 693-695.
- Khokhani, D., Lowe-Power, T. M., Tran, T. M., Allen, C. (2017). A single regulator mediates strategic switching between attachment/spread and growth/virulence in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *MBio*, 8(5), e00895-17.
- Kim-Lee, H., Moon, J. S., Hong, Y. J., Kim, M. S., and Cho, H. M. (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.
- Kim, B., Hwang, I. S., Lee, H. J., Lee, J. M., Seo, E., Choi, D., Oh, C. S. (2018). Identification of a molecular marker tightly linked to bacterial wilt resistance in tomato by genome-wide SNP analysis. *Theoretical and applied genetics*, 131(5), 1017-1030.
- Kim, M. C., Chung, W. S., Yun, D. J., Cho, M. J. (2009). Calcium and calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. *Molecular plant*, 2(1), 13-21.
- Kleinhenz, M. D., Palta, J. P. (2002). Root zone calcium modulates the response of potato plants to heat stress. *Physiologia plantarum*, 115(1), 111-118.
- Kohlmeier, S., Mancuso, M., Tecon, R., Harms, H., van der Meer, J.R., Wells, M. (2007). Bioreporters: gfp versus lux revisited and single-cell response. *Biosens. Bioelectron.* 22:1578-1585.
- Kolbe, H., Stephan-Beckmann, S. (1997a). Development, growth and chemical composition of the potato crop (*Solanum tuberosum* L.). I. Leaf and stem. *Potato research*, 40(1), 111-129.
- Kolbe, H., Stephan-Beckmann, S. (1997b). Development, growth and chemical composition of the potato crop (*Solanum tuberosum* L.). II. Tuber and whole plant. *Potato Research*, 40(2), 135-153.
- Kumar, M., Singh, T. H., Sadashiva, A. T., Reddy, K. M., Reddy, L. (2019). Screening of eggplant (*Solanum melongena* L.) genotypes to isolate the stable source of resistance for bacterial wilt. *IJCS*, 7(3), 3274-3277.
- Kunkel, B. N., Harper, C. P. (2017). The roles of auxin during interactions between bacterial plant pathogens and their hosts. *Journal of experimental botany*, 69(2), 245-254.
- Kunwar, S., Iriarte, F., Fan, Q., Evaristo da Silva, E., Ritchie, L., Nguyen, N. S., Freeman, J., Stall, R., Jones, J., Minsavage, G., Colee, J., Scott, J., Vallad, G., Zipfel, C., Horvath, D., Westwood, J., Hutton, S., Paret, M. (2018). Transgenic expression of EFR and Bs2 genes for field management of bacterial wilt and bacterial spot of tomato. *Phytopathology*, 108(12), 1402-1411.
- Kwak, M. J., Kong, H. G., Choi, K., Kwon, S. K., Song, J. Y., Lee, J., Lee, P., Choi, S.Y., Seo, M., Lee, H.J., Jung, E.J., Park, H., Roy, N., Heebal, K., Lee, M.M., Rubin, E.M., Lee, S.W., Kim, J.F. (2018). Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. *Nature biotechnology*, 36(11), 1100.

- Lacombe, S., Rougon-Cardoso, A., Sherwood, E., Peeters, N., Dahlbeck, D., Van Esse, H. P., et al. (2010). Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature biotechnology*, 28(4), 365.
- Laferriere, L. T., Helgeson, J. P., and Allen, C. (1999). Fertile *Solanum tuberosum* + *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theor. Appl. Genet.* 98:1272-1278.
- Lamb, C., Dixon, R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 251-275.
- Lavie, M., Shillington, E., Eguiluz, C., Grimsley, N., Boucher, C. (2002). PopP1, a new member of the YopJ/AvrRxv family of type III effector proteins, acts as a host-specificity factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia solanacearum*. *Molecular plant-microbe interactions*, 15(10), 1058-1068.
- Le Roux, C., Huet, G., Jauneau, A., Camborde, L., Trémousaygue, D., Kraut, A., et al. (2015). A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. *Cell*, 161(5), 1074-1088.
- Lebeau, 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.
- Lemaga, B., Kakuhenzire, R., Kassa, B., Ewell, P. T., Priou, S., Allen, C., et al. (2005). Integrated control of potato bacterial wilt in eastern Africa: the experience of African highlands initiative. *Bacterial wilt disease and the Ralstonia solanacearum species complex*, 145-157.
- Lemaga, B., Siriri, D., Ebanyat, P. (2001). Effect of soil amendments on bacterial wilt incidence and yield of potatoes in southwestern Uganda. *African Crop Science Journal*, 9(1), 267-278.
- Li, X., Chan, K., Ramer, R. (2018). Fabrication of Through via Holes in Ultra-Thin Fused Silica Wafers for Microwave and Millimeter-Wave Applications. *Micromachines*, 9(3), 138.
- Li, X., Liu, Y., Cai, L., Zhang, H., Shi, J., Yuan, Y. (2017). Factors affecting the virulence of *Ralstonia solanacearum* and its colonization on tobacco roots. *Plant pathology*, 66(8), 1345-1356.
- Lin, W. C., Lu, C. F., Wu, J. W., Cheng, M. L., Lin, Y. M., Yang, N. S., et al. (2004). Transgenic tomato plants expressing the Arabidopsis NPR1 gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. *Transgenic research*, 13(6), 567-581.
- Liu, F., Wei, F., Wang, L., Liu, H., Zhu, X., Liang, Y. (2010). Riboflavin activates defense responses in tobacco and induces resistance against *Phytophthora parasitica* and *Ralstonia solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(5-6), 330-336.
- Liu, H., Kang, Y., Genin, S., Schell, M. A., & Denny, T. P. (2001). Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology*, 147(12), 3215-3229.
- Liu, L., Sun, C., Liu, X., He, X., Liu, M., Wu, H., et al. (2016). Effect of calcium cyanamide, ammonium bicarbonate and lime mixture, and ammonia water on survival of *Ralstonia solanacearum* and microbial community. *Scientific reports*, 6, 19037.
- Locascio, S. J., Bartz, J. A., Weingartner, D. P. (1992). Calcium and potassium fertilization of potatoes grown in North Florida I. Effects on potato yield and tissue Ca and K concentrations. *American Potato Journal*, 69(2), 95-104.
- Lopes, C. A., Melo, P. E. D., Rossato, M., Pereira, A. D. S. (2018). Breeding potatoes for resistance to bacterial blight in Brazil: a quick review in face of a more effective screening protocol. *Horticultura Brasileira*, 36(1), 6-12.

- López M.M and Biosca E.G. (2005). Potato bacterial wilt management: new prospects for an old problem. In: Bacterial Wilt: The Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, y A.C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 205-224.
- Lowe-Power, T. M., Khokhani, D., Allen, C. (2018b). How *Ralstonia solanacearum* exploits and thrives in the flowing plant xylem environment. *Trends in microbiology*, 26(11), 929-942.
- Lowe-Power, T. M., Hendrich, C. G., von Roepenack-Lahaye, E., Li, B., Wu, D., Mitra, R., et al. (2018a). Metabolomics of tomato xylem sap during bacterial wilt reveals *Ralstonia solanacearum* produces abundant putrescine, a metabolite that accelerates wilt disease. *Environmental microbiology*, 20(4), 1330-1349.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., Ton, J. (2011). Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24:183-193.
- Luo, H., Pandey, M. K., Khan, A. W., Wu, B., Guo, J., Ren, X., et al. (2019). Next-generation sequencing identified genomic region and diagnostic markers for resistance to bacterial wilt on chromosome B02 in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant biotechnology journal*.
- Mandal, S., Das, R.K., Mishra, S. (2011). Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiol. Biochem.* 49:117-123.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., et al. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13:614-629.
- Marian, M., Morita, A., Koyama, H., Suga, H., Shimizu, M. (2019). Enhanced biocontrol of tomato bacterial wilt using the combined application of *Mitsuaria* sp. TWR114 and nonpathogenic *Ralstonia* sp. TCR112. *Journal of General Plant Pathology*, 85(2), 142-154.
- McClerklin, S. A., Lee, S. G., Harper, C. P., Nwumeh, R., Jez, J. M., Kunkel, B. N. (2018). Indole-3-acetaldehyde dehydrogenase-dependent auxin synthesis contributes to virulence of *Pseudomonas syringae* strain DC3000. *PLoS pathogens*, 14(1), e1006811.
- Meng, F. (2013). The virulence factors of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *J Plant Pathol Microbiol*, 4(168), 10-4172.
- Meng, Y., Li, Y., Galvani, C. D., Hao, G., Turner, J. N., Burr, T. J., Hoch, H. C. (2005). Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus-driven twitching motility. *Journal of bacteriology*, 187(16), 5560-5567.
- Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W., Molina, A. (2014). The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Front. Plant Sci.* 5:358-370.
- Monteiro, F., Genin, S., van Dijk, I., and Valls, M. (2012a). A luminescent reporter evidences active expression of *Ralstonia solanacearum* type III secretion system genes throughout plant infection. *Microbiology* 158:2107-2116.
- Monteiro, F., Sole, M., van Dijk, I., and Valls, M. (2012b). A chromosomal insertion toolbox for promoter probing, mutant complementation, and pathogenicity studies in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:557-568.
- Montesinos, E., Bonaterra, A., Badosa, E., Frances, J., Alemany, J., Llorente, I., Moragrega, C. (2002). Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *International Microbiology*, 5(4), 169-175.
- Morais, T. P., Zaini, P. A., Chakraborty, S., Gouran, H., Carvalho, C. P., Almeida-Souza, H. O., et al. (2019). The plant-based chimeric antimicrobial protein SIP14a-PPC20 protects tomato against bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant science*, 280, 197-205.

- Mosher, S., Seybold, H., Rodriguez, P., Stahl, M., Davies, K. A., Dayaratne, S., et al. (2013). The tyrosine-sulfated peptide receptors PSKR1 and PSY1R modify the immunity of *Arabidopsis* to biotrophic and necrotrophic pathogens in an antagonistic manner. *The Plant Journal*, 73(3), 469-482.
- Mou, S., Liu, Z., Gao, F., Yang, S., Su, M., Shen, L., et al. (2017). CaHDZ27, a Homeodomain-Leucine zipper I protein, positively regulates the resistance to *Ralstonia solanacearum* infection in pepper. *Molecular plant-microbe interactions*, 30(12), 960-973.
- Muthoni, J., Shimelis, H., and Melis, R. (2012). Management of bacterial wilt of potatoes: Opportunities for host resistance in Kenya. *J. Agric. Sci.* 4:64-78.
- Nakahara, H., Mori, T., Sadakari, N., Matsusaki, H., Matsuzoe, N. (2016). Selection of effective non-pathogenic *Ralstonia solanacearum* as biocontrol agents against bacterial wilt in eggplant. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 123(3), 119-124.
- Nakaho, K. (1997). Distribution and multiplication of *Ralstonia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) in tomato plants of resistant rootstock cultivar L S-89 and susceptible Ponderosa. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63:83-88.
- Nakaho, K., Hibino, H., Miyagawa, H. (2000). Possible mechanisms limiting movement of *Ralstonia solanacearum* in resistant tomato tissues. *J. Phytopathology*. 148:181-190.
- Nakaho, K., Inoue, H., Takayama, T., Miyagawa, H. (2004). Distribution and multiplication of *Ralstonia solanacearum* in tomato plants with resistance derived from different origins. *J. Gen. Plant Pathol.* 70:115-119.
- Nakaho, K., Seo, S., Ookawa, K., Inoue, Y., Ando, S., Kanayama, Y., et al. (2017). Involvement of a vascular hypersensitive response in quantitative resistance to *Ralstonia solanacearum* on tomato rootstock cultivar LS-89. *Plant Pathology*, 66(1), 150-158.
- Namisy, A., Chen, J. R., Prohens, J., Metwally, E., Elmahrouk, M., Rakha, M. (2019). Screening Cultivated Eggplant and Wild Relatives for Resistance to Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Agriculture*, 9(7), 157.
- Narancio, R., Zorrilla, P., Robello, C., Gonzalez, M., Vilaro, F., Pritsch, C., et al. (2013). Insights on gene expression response of a characterized resistance genotype of *Solanum commersonii* Dun. against *Ralstonia solanacearum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 136:823-835.
- Narusaka, M., Kubo, Y., Hatakeyama, K., Imamura, J., Ezura, H., Nanasato, Y., et al. (2013). Interfamily transfer of dual NB-LRR genes confers resistance to multiple pathogens. *PLoS One*, 8(2), e55954.
- Navarrete, F., De La Fuente, L. (2014). Response of *Xylella fastidiosa* to zinc: decreased culturability, increased exopolysaccharide production, and formation of resilient biofilms under flow conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(3), 1097-1107.
- Nicot, N., Hausman, J. F., Hoffmann, L., Evers, D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of experimental botany*, 56(421), 2907-2914.
- Noman, A., Liu, Z., Yang, S., Shen, L., Hussain, A., Ashraf, M. F., et al. (2018). Expression and functional evaluation of CaZNF830 during pepper response to *Ralstonia solanacearum* or high temperature and humidity. *Microbial pathogenesis*, 118, 336-346.
- Opina N., Tavner F., Hollway G., Wang J.-F., Li T.-H., Maghirang R., Fegan M., Hayward, A.C., Krishnapillai V., Hong W.-F., Holloway B.W., and Timmis J.N. (1997). A novel method for development of species and strain specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia-Pac J. Mol. Biol.* 5:19-30.

- Pagel, W., Heitefuss, R. (1989). Calcium content and cell wall polygalacturonans in potato tubers of cultivars with different susceptibilities to *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 35(1), 11-21.
- Palomo J.L. (2000). Bacteriosis de cuarentena del cultivo de la patata en Europa. En: Libro de actas del Congreso Iberoamericano de Investigación y Desarrollo de la Patata. Patata 2000. J. Pascualena, E. Ritter, eds. Vitoria-Gastéis. España, 461-471.
- Papenfort, K., Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576.
- Patel, A. B., Patel, R. N., Gami, R. A., Patel, J. A., Patel, P. C. (2018). Genetic Variability Among the Potato (*Solanum Tuberosum* L.) Genotypes as Affected by Harvesting Period for Processing Purpose and Tuber Yield. *Current Agriculture Research Journal*, 6(3), 372-377.
- Peeters, N., Carrère, S., Anisimova, M., Plener, L., Cazalé, A. C., Genin, S. (2013b). Repertoire, unified nomenclature and evolution of the Type III effector gene set in the *Ralstonia solanacearum* species complex. *BMC genomics*, 14(1), 859.
- Peeters, N., Guidot, A., Vailleau, F., and Valls M. (2013a). *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Mol. Plant Pathol.* 14:651-662.
- Pianzola, M. J. (2012). Manejo de enfermedades de la patata en Suramérica y su aplicación al campo europeo. *Tierras de Castilla y León: Agricultura*, (188), 65-71.
- Pianzola, M. J., Zarantonelli, L., González, G., Franco Fraguas, L., Vázquez, A. (2005). Genetic, phytochemical and biochemical analyses as tools for biodiversity evaluation of wild *Solanum commersonii* accessions. *Biochem. Syst. Ecol.* 33:67-78.
- Planas-Marquès, M., Bernardo-Faura, M., Paulus, J., Kaschani, F., Kaiser, M., Valls, M., et al. (2018). Protease activities triggered by *Ralstonia solanacearum* infection in susceptible and tolerant tomato lines. *Molecular & Cellular Proteomics*, 17(6), 1112-1125.
- Poueymiro, M., Genin, S. (2009). Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Current opinion in microbiology*, 12(1), 44-52.
- Prior, P., Ailloud, F., Dalsing, B. L., Remenant, B., Sanchez, B., Allen, C. (2016). Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. *BMC genomics*, 17(1), 90.
- Prior, P., Bart, S., Leclercq, S., Darrasse, A., Anais, G. (1996). Resistance to bacterial wilt in tomato as discerned by spread of *Pseudomonas (Burholderia) solanacearum* in the stem tissues. *Plant Pathology*, 45(4), 720-726.
- Priou S., Aley P. and L. Gutarra. (2005). Assessment of resistance to bacterial wilt in CIP advanced potato clones. In: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia Solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior A.C. Hayward, eds. APS Press, St. Paul, MN, 261-267.
- Priou S., Gutarra L., Aley P., De Mendiburu F., y Llique R. (2010). Detection of *Ralstonia solanacearum* (biovar 2A) in stems of symptomless plants before harvest of the potato crop using post-enrichment DAS-ELISA. *Plant Pathol.* 59: 59-67.
- Priou S., Salas C., de Mendiburu F., Aley P. and L. Gutarra. (2001). Assessment of Latent Infection Frequency in Progeny Tubers of Advanced Potato Clones Resistant to Bacterial Wilt: A New Selection Criterion. *Potato Research*, 44: 359-373.
- Roca, W. M., Espinoza, N. O., Roca, M. R., Bryan, J. E. (1978). A tissue culture method for the rapid propagation of potatoes. *American potato journal*, 55(12), 691-701.

- Rodiuc, N., Barlet, X., Hok, S., Perfus-Barbeoch, L., Allasia, V., Engler, G., et al. (2016). Evolutionarily distant pathogens require the *Arabidopsis* phyto-sulfokine signalling pathway to establish disease. *Plant, cell & environment*, 39(7), 1396-1407.
- Roux, F., Voisin, D., Badet, T., Balagué, C., Barlet, X., Huard-Chauveau, C., et al. (2014). Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map. *Molecular plant pathology*, 15(5), 427-432.
- Rusconi, R., Stocker, R. (2015). Microbes in flow. *Current opinion in microbiology*, 25, 1-8.
- Saddler G.S. (2005). Management of bacterial wilt disease. In: Bacterial Wilt: The Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, A.C. Hayward, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 121-132.
- Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., Kappler, U. (2014). Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64:3087–3103.
- Saile, E., McGarvey, J. A., Schell, M. A., Denny, T. P. (1997). Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*, 87(12), 1264-1271.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., et al. (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, 415(6871), 497.
- Salgon, S., Jourda, C., Sauvage, C., Daunay, M. C., Reynaud, B., Wicker, E., Dintinger, J. (2017). Eggplant resistance to the *Ralstonia solanacearum* species complex involves both broad-spectrum and strain-specific quantitative trait loci. *Frontiers in plant science*, 8, 828.
- Salgon, S., Raynal, M., Lebon, S., Baptiste, J. M., Daunay, M. C., Dintinger, J., Jourda, C. (2018). Genotyping by sequencing highlights a polygenic resistance to *Ralstonia pseudosolanacearum* in eggplant (*Solanum melongena* L.). *International journal of molecular sciences*, 19(2), 357.
- Salt, D. E., Baxter, I., Lahner, B. (2008). Ionomics and the study of the plant ionome. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 709-733.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (2000). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- Santiago, T. R., Lopes, C. A., Caetano-Anollés, G., Mizubuti, E. S. G. (2017). Phylotype and sequevar variability of *Ralstonia solanacearum* in Brazil, an ancient centre of diversity of the pathogen. *Plant pathology*, 66(3), 383-392.
- Santos, B. M., Gilreath, J. P., Motis, T. N., Noling, J. W., Jones, J. P., Norton, J. A. (2006). Comparing methyl bromide alternatives for soilborne disease, nematode and weed management in fresh market tomato. *Crop Protection*, 25(7), 690-695.
- Schacht, T., Unger, C., Pich, A., Wydra, K. (2011). Endo- and exopolygalacturonases of *Ralstonia solanacearum* are inhibited by polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) activity in tomato stem extracts. *Plant Physiology and biochemistry*, 49(4), 377-387.
- Schell, M. A. (2000). Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annual review of phytopathology*, 38(1), 263-292.
- Schmittgen, T. D., Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. *Nature protocols*, 3(6), 1101.

- Sequeira, L., Rowe, P. R. (1969). Selection and utilization of *Solanum phureja* clones with high resistance to different strains of *Pseudomonas solanacearum*. *American Potato Journal*, 46(12), 451-462.
- Shakoor, N., Ziegler, G., Dilkes, B. P., Brenton, Z., Boyles, R., Connolly, E. L., et al. (2016). Integration of experiments across diverse environments identifies the genetic determinants of variation in *Sorghum bicolor* seed element composition. *Plant physiology*, 170(4), 1989-1998.
- Sharma, D., Singh, Y. (2018). Compatibility of Bio-control agents with bactericides for controlling bacterial wilt of tomato. *IJCS*, 6(2), 1173-1178.
- Sharma, J. P., Kumar, S. (2000). Management of *Ralstonia* wilt through soil disinfectant, mulch, lime and cakes in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 70(1), 17-19.
- Shen, L., Yang, S., Yang, T., Liang, J., Cheng, W., Wen, J., et al. (2016). CaCDPK15 positively regulates pepper responses to *Ralstonia solanacearum* inoculation and forms a positive-feedback loop with CaWRKY40 to amplify defense signaling. *Scientific reports*, 6, 22439.
- Shin, I. S., Hsu, J. C., Huang, S. M., Chen, J. R., Wang, J. F., Hanson, P., Schafleitner, R. (2019). Construction of a Single-Nucleotide Polymorphism Marker Based Quantitative Trait Loci Map and Validation of Resistance Loci to Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum*) in Tomato.
- Simmons, K. E., Kelling, K. A. (1987). Potato responses to calcium application on several soil types. *American Potato Journal*, 64(3), 119-136.
- Simmons, K. E., Kelling, K. A., Wolkowski, R. P., Kelman, A. (1988). Effect of calcium source and application method on potato yield and cation composition. *Agronomy Journal*, 80(1), 13-21.
- Siri M.I., Galván G., Quirici L., Villanueva P., Ferreira F., Franco Fraguas L., Pianzzola M.J. (2009). Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. *Euphytica*, 165 (2): 371-382.
- Siri M.I., Sanabria A., Pianzzola M.J. (2011). Genetic diversity and variation in aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains (phylo type II, sequevar 1) causing bacterial wilt of potato in Uruguay. *Plant Disease*. Submitted paper.
- Siri M.I., Villanueva P., Pianzzola M.J., Franco Fraguas L., Galván G., Acosta M., Ferreira F. (2005). In vitro antimicrobial activity of different accessions of *Solanum commersonii* Dun from Uruguay. *Potato Research*. 47: 127-138.
- Skerman, V. B. D., McGowan, V., Sneath, P. H. A. (1980). Approved lists of bacterial names. *International journal of systematic bacteriology*, 30(1), 225-230.
- Smith, E. F. (1896). A bacterial disease of the tomato, eggplant and Irish potato. US Dept. Agric. Div. Veg. Phys. Path. Bull., 12, 1-26.
- Smith, E. F. (1914). *Bacteria in Relation to Plant Diseases*. Carnegie Institute, Washington, DC.
- Solé, M., Popa, C., Mith, O., Sohn, K. H., Jones, J. D., Deslandes, L., Valls, M. (2012). The awr gene family encodes a novel class of *Ralstonia solanacearum* type III effectors displaying virulence and avirulence activities. *Molecular plant-microbe interactions*, 25(7), 941-953.
- Spooner, D. M., Hijmans, R. J. (2001). Potato systematics and germplasm collecting, 1989–2000. *American Journal of Potato Research*, 78(4), 237.
- Stone, B.A., Clarke, A.E. (1992). *Chemistry and Biology of (1→3)-β-glucans*. Bundoora: La Trobe University Press.
- Strittmatter, C. (1979). Modificación de una técnica de coloración safranina-fast green. *Bol. Soc. Argen. Bot.* 18, 121-122.

- Stulberg, M. J., Cai, X., Ahmad, A. A., Huang, Q. (2018). Identification of a DNA region associated with the cool virulence of *Ralstonia solanacearum* strain UW551 and its utilization for specific detection of the bacterium's race 3 biovar 2 strains. *PLoS one*, 13(11), e0207280.
- 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*.
- Sun, D., Zhuo, T., Hu, X., Fan, X., Zou, H. (2017). Identification of a *Pseudomonas putida* as biocontrol agent for tomato bacterial wilt disease. *Biological control*, 114, 45-50.
- Swanson J.K., Yao J., Tans-Kersten J.K., Allen C. (2005). Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent active infection of geranium. *Phytopathology* 95: 136-143.
- Tans-Kersten, J., Huang, H., Allen, C. (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *Journal of bacteriology*, 183(12), 3597-3605.
- Tawfik, A. A., Kleinhenz, M. D., Palta, J. P. (1996). Application of calcium and nitrogen for mitigating heat stress effects on potatoes. *American potato journal*, 73(6), 261-273.
- Teige, M. (2019). Chloroplasts use calcium signals to call for help under heat stress. *Plant and Cell Physiology*, 60(3), 492-493.
- Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge D. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *Plant J.* 11:1187-1194.
- Torres, M. A., Jones, J. D., Dangl, J. L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant physiology*, 141(2), 373-378.
- Tran, T.M., MacIntyre, A., Khokhani, D., Hawes, M., Allen, C. (2016). Extracellular DNases of *Ralstonia solanacearum* modulate biofilms and facilitate bacterial wilt virulence. *Environmental microbiology*, 18(11), 4103-4117.
- Tzeng, K. C., Kelman, A., Simmons, K. E., Kelling, K. A. (1986). Relationship of calcium nutrition to internal brown spot of potato tubers and sub-apical necrosis of sprouts. *American Potato Journal*, 63(2), 87-97.
- Untergasser A., Nijveen H., Rao X., Bisseling T., Geurts R., and Leunissen J.A.M. (2007). Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucl. Ac. Res.* 35:W71-W74.
- USDA-United States Department of Agriculture. (2004). *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. Southern Geranium. New Pest Response Guidelines. USDA, APHIS, PPQ. Riverdale, MD.
- Vailleau, F., Sartorel, E., Jardinaud, M. F., Chardon, F., Genin, S., Huguet, T., et al. (2007). Characterization of the interaction between the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* and the model legume plant *Medicago truncatula*. *Molecular plant-microbe interactions*, 20(2), 159-167.
- Van der Linden, L., Bredenkamp, J., Naidoo, S., Fouché-Weich, J., Denby, K. J., Genin, S., et al. (2013). Gene-for-gene tolerance to bacterial wilt in *Arabidopsis*. *Molecular plant-microbe interactions*, 26(4), 398-406.
- van Elsland J.D., Kastelein P., Van Bekkum P., Van der Wolf J.M., De Vries P.M., Van Overbeek L.S. (2000). Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microcosm soils in temperate climates. *Phytopathology* 90:1358–1366.
- Vasse, J., Frey, P., Trigalet, A. (1995). Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 8(2), 241-251.

- Vázquez, A., González, G., Ferreira, F., Moyna, P., Kenne, L. (1997). Glycoalkaloids of *Solanum commersonii* Dun. ex Poir. *Euphytica*, 95(2), 195-201.
- Vega-Celedón, P., Canchignia Martínez, H., González, M., Seeger, M. (2016). Biosíntesis de ácido indol-3-acético y promoción del crecimiento de plantas por bacterias. *Cultivos Tropicales*, 37, 33-39.
- Vega, S. E., Bamberg, J. B., Palta, J. P. (1996). Potential for improving freezing stress tolerance of wild potato germplasm by supplemental calcium fertilization. *American potato journal*, 73(9), 397-409.
- Vilaró F., Gonzalez, M. (2017). Papas. En: Catálogo de Cultivares Hortícolas. M. Gonzalez, G. Gimenez, eds. INIA, Montevideo, 40-45.
- Vinh, M. T., Tung, T. T., Quang, H. X. (2005). Primary bacterial wilt study on tomato in vegetable areas of Ho Chi Minh city, Vietnam. In: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, 177-184.
- Voigt, C.A. (2014). Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Front. Plant Sci.* 5:168-173.
- Vudhivanich, S. (2002). Effect of soil amendment with urea and calcium oxide on survival of *Ralstonia solanacearum*, the causal agent of bacterial wilt or rhizome rot of ginger. *Kasetsart Journal (Natural Sciences)*, 36, 242-247.
- Wang, G., Kong, J., Cui, D., Zhao, H., Niu, Y., Xu, M., et al. (2019). Resistance against *Ralstonia solanacearum* in tomato depends on the methionine cycle and the γ -aminobutyric acid metabolic pathway. *The Plant Journal*, 97(6), 1032-1047.
- Wang, J. F., Ho, F. I., Truong, H. T. H., Huang, S. M., Balatero, C. H., Dittapongpitch, V., Hidayati, N. (2013). Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar 'Hawaii 7996' to *Ralstonia solanacearum*. *Euphytica* 190:241-252.
- Wang, J. F., Lin, C. H. (2005). Integrated management of tomato bacterial wilt. AVRDC-The World Vegetable Center.
- Wang, K., Kang, L., Anand, A., Lazarovits, G., Mysore, K.S. (2007). Monitoring in planta bacterial infection at both cellular and whole-plant levels using the green fluorescent protein variant GFPuv. *New Phytol.* 174:212-223.
- Wang, L., Cai, K., Chen, Y., Wang, G. (2013). Silicon-mediated tomato resistance against *Ralstonia solanacearum* is associated with modification of soil microbial community structure and activity. *Biological trace element research*, 152(2), 275-283.
- Wang, N., Wang, L., Zhu, K., Hou, S., Chen, L., Mi, D., et al. (2019). Plant Root Exudates Are Involved in *Bacillus cereus* AR156 Mediated Biocontrol Against *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in microbiology*, 10, 98.
- Watanabe, T., Maejima, E., Yoshimura, T., Urayama, M., Yamauchi, A., Owadano, M., et al. (2016). The ionic study of vegetable crops. *PloS one*, 11(8), e0160273.
- Wei, C., Liu, J., Maina, A. N., Mwaura, F. B., Yu, J., Yan, C., et al. (2017). Developing a bacteriophage cocktail for biocontrol of potato bacterial wilt. *Virologica Sinica*, 32(6), 476-484.
- Wu, K., Su, L., Fang, Z., Yuan, S., Wang, L., Shen, B., Shen, Q. (2017). Competitive use of root exudates by *Bacillus amyloliquefaciens* with *Ralstonia solanacearum* decreases the pathogenic population density and effectively controls tomato bacterial wilt. *Scientia Horticulturae*, 218, 132-138.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., et al. (1992). Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiology and immunology*, 36(12), 1251-1275.

- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Yano, I., Hotta, H., Nishiuchi, Y. (1995). Transfer of Two *Burkholderia* and An *Alcaligenes* Species to *Ralstonia* Gen. Nov. Proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) Comb. Nov. *Microbiology and immunology*, 39(11), 897-904.
- Yadeta, K.A., Thomma, B.P. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Front. Plant Sci.* 4:97-108.
- Yamazaki, H., Hoshina, T. (1995). Calcium nutrition affects resistance of tomato seedlings to bacterial wilt. *HortScience*, 30(1), 91-93.
- Yamazaki, H., Kikuchi, S., Hoshina, T., Kimura, T. (1999). Effect of calcium concentration in nutrient solution before and after inoculation with *Ralstonia solanacearum* on resistance of tomato seedlings to bacterial wilt. *Soil science and plant nutrition*, 45(4), 1009-1014.
- Yamazaki, H., Kikuchi, S., Hoshina, T., Kimura, T. (2000). Effect of calcium concentration in nutrient solution on development of bacterial wilt and population of its pathogen *Ralstonia solanacearum* in grafted tomato seedlings. *Soil science and plant nutrition*, 46(2), 535-539.
- Yang, H., Li, J., Xiao, Y., Gu, Y., Liu, H., Liang, Y., et al. (2017). An integrated insight into the relationship between soil microbial community and tobacco bacterial wilt disease. *Frontiers in microbiology*, 8, 2179.
- Yang, Y., Yu, Y., Liang, Y., Anderson, C. T., Cao, J. (2018). A profusion of molecular scissors for pectins: classification, expression, and functions of plant polygalacturonases. *Frontiers in plant science*, 9, 1208.
- Yao, J., Allen, C. (2006). Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of bacteriology*, 188(10), 3697-3708.
- Yao, J., Allen, C. (2007). The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *Journal of bacteriology*, 189(17), 6415-6424.
- Yasuda, N., Mitsunaga, T., Hayashi, K., Koizumi, S., Fujita, Y. (2015). Effects of pyramiding quantitative resistance genes pi21, Pi34, and Pi35 on rice leaf blast disease. *Plant disease*, 99(7), 904-909.
- Yencho, G. C., McCord, P. H., Haynes, K. G., Sterrett, S. R. (2008). Internal heat necrosis of potato a review. *American journal of potato research*, 85(1), 69-76.
- Youssef, S. A., Tartoura, K. A. (2013). Compost enhances plant resistance against the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* via up-regulation of ascorbate-glutathione redox cycle. *European journal of plant pathology*, 137(4), 821-834.
- Yuan, S., Li, M., Fang, Z., Liu, Y., Shi, W., Pan, B., et al. (2016). Biological control of tobacco bacterial wilt using *Trichoderma harzianum* amended bioorganic fertilizer and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae*. *Biological control*, 92, 164-171.
- Yuliar, N. A., Toyota, K. (2015). Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes and environments*, ME14144.
- Zhang, C., Chen, H., Cai, T., Deng, Y., Zhuang, R., Zhang, N., et al. (2017a). Overexpression of a novel peanut NBS-LRR gene A h RRS 5 enhances disease resistance to *Ralstonia solanacearum* in tobacco. *Plant biotechnology journal*, 15(1), 39-55.
- Zhang, C., Lin, Y., Tian, X., Xu, Q., Chen, Z., Lin, W. (2017b). Tobacco bacterial wilt suppression with biochar soil addition associates to improved soil physiochemical properties and increased rhizosphere bacteria abundance. *Applied Soil Ecology*, 112, 90-96.
- Zhang, Y., Lv, Y., Jahan, N., Chen, G., Ren, D., Guo, L. (2018). Sensing of Abiotic Stress and Ionic Stress Responses in Plants. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3298.

- Zhuo, T., Chen, S., Fan, X., Hu, X., Zou, H. (2019). An improved control efficacy against tobacco bacterial wilt by an engineered *Pseudomonas mosselii* expressing the ripAA gene from phytopathogenic *Ralstonia solanacearum*. *bioRxiv*, 510628.
- Ziegler, G., Terauchi, A., Becker, A., Armstrong, P., Hudson, K., Baxter, I. (2013). Ionomics screening of field-grown soybean identifies mutants with altered seed elemental composition. *The Plant Genome*, 6(2).
- 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*. 16:246-261.

ANEXOS

Publicaciones

A Novel, Sensitive Method to Evaluate Potato Germplasm for Bacterial Wilt Resistance Using a Luminescent *Ralstonia solanacearum* Reporter Strain

Andrea Paola Zuluaga Cruz,^{1,2} Virginia Ferreira,³ María Julia Pianzzola,³ María Inés Siri,³ Núria S. Coll,² and Marc Valls^{1,2}

¹Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 643, Catalonia, Spain; ²Centre for Research in Agricultural Genomics (CRAG), Edifici CRAG, Campus UAB, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain; ³Cátedra de Microbiología, Dep. de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Av. Gral. Flores 2124, CP11800, Montevideo, Uruguay

Submitted 11 October 2013. Accepted 20 November 2013.

Several breeding programs are under way to introduce resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in solanaceous crops. The lack of screening methods allowing easy measurement of pathogen colonization and the inability to detect latent (i.e., symptomless) infections are major limitations when evaluating resistance to this disease in plant germplasm. We describe a new method to study the interaction between *R. solanacearum* and potato germplasm that overcomes these restrictions. The *R. solanacearum* UY031 was genetically modified to constitutively generate light from a synthetic *luxCDABE* operon stably inserted in its chromosome. Colonization of this reporter strain on different potato accessions was followed using life imaging. Bacterial detection in planta by this nondisruptive system correlated with the development of wilting symptoms. In addition, we demonstrated that quantitative detection of the recombinant strain using a luminometer can identify latent infections on symptomless potato plants. We have developed a novel, unsophisticated, and accurate method for high-throughput evaluation of pathogen colonization in plant populations. We applied this method to compare the behavior of potato accessions with contrasting resistance to *R. solanacearum*. This new system will be especially useful to detect latency in symptomless parental lines before their inclusion in long-term breeding programs for disease resistance.

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the world's most devastating bacterial diseases of plants (Peeters et al. 2013). It is present worldwide, threatening food safety of small producers in tropical and subtropical areas, especially in China, Bangladesh, Bolivia, and Uganda (Martin and French 1985; Muthoni et al. 2012). However, because the pathogen disseminates easily to long distances via infected plant material (Hayward and Pegg 2013; Janse et al. 2004), there has been a recent spread of the disease to temperate

regions (Genin and Boucher 2004). *R. solanacearum* exhibits an extremely wide host range, causing bacterial wilt on more than 200 plant species, including commercially important crops such as potato, tomato, and banana (Hayward 1991). Wilting symptoms are caused by extensive multiplication of the bacterium in the xylem vessels, which hinders water flow in the plant. In addition, the bacterium can colonize asymptotically several weeds that act as pathogen reservoirs (Genin and Denny 2012) and survive in waterways and soil for long periods (Caruso et al. 2005; Elphinstone 2005). These facts, together with the lack of resistant commercial varieties in any of its hosts (Hong et al. 2005), render the control of bacterial wilt very challenging.

R. solanacearum is considered a species complex, divided into four phylotypes which roughly reflect their geographic origin: phylotype I groups strains from Asia, phylotype II from the Americas, phylotype III from Africa, and phylotype IV from Indonesia (Peeters et al. 2013). Each phylotype is subdivided into different sequevars which are clusters of isolates with highly conserved DNA sequences (Fegan and Prior 2005). Strains belonging to the phylotype IIB, sequevar 1 (IIB1) are the main strains responsible for bacterial wilt of potato in cold and temperate regions (Denny 2006). Moreover, IIB1 strains have the ability to produce symptomless latent infections, which facilitates the dissemination of the pathogen worldwide, hindering disease control (Janse 1996; Swanson et al. 2005; Williamson et al. 2002). UY031 is a highly aggressive strain that belongs to this sequevar and was isolated from potato tubers in 2003 in Uruguay (Siri and Pianzzola 2011; Siri et al. 2009).

Effective resistance against *R. solanacearum* is lacking in commercial varieties of any of its host crops (Hong et al. 2005). However, loci providing quantitative resistance have been identified in tobacco (Qian et al. 2012), tomato (Carmeille et al. 2006; Wang et al. 2013), and eggplant (Lebeau et al. 2013). In potato, breeding programs for resistance to bacterial wilt have used wild species related to *Solanum tuberosum* as sources of resistance (Narancio et al. 2013; Sequeira and Rowe 1969). Initially, *S. phureja* was used to successfully introgress resistance (Carputo et al. 2009; French and De Lindo 1982; Sequeira and Rowe 1969). More recently, the tuber-bearing species *S. commersonii* Dun (Hawkes 1994) has emerged as a source of high resistance against bacterial wilt. This wild species exhibits a high genetic diversity (Pianzzola et al. 2005; Siri et al. 2009) and encodes many desirable traits, such as tolerance to low temperatures and resistance to several pathogens, including *R. solanacearum*

A. P. Z. Cruz and V. Ferreira contributed equally to this work.

Corresponding author: N. S. Coll;
E-mail: nuria.sanchez-coll@cragenomica.es

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that six supplementary figures and three supplementary tables are published online.

(Carputo et al. 2009; Galván et al. 2006; Gonzalez et al. 2013; Kim-Lee et al. 2005; Laferriere et al. 1999; Narancio et al. 2013; Siri et al. 2009). Due to these valuable traits, *S. commersonii* is being used as the main genetic resource for the potato breeding program held in Uruguay, focused on the development of improved potato varieties with high levels of field resistance to bacterial wilt (Galván et al. 2006; Gonzalez et al. 2013; Narancio et al. 2013).

Germplasm showing resistance to *R. solanacearum* at high altitudes often becomes susceptible when grown at warmer temperatures in the lowlands (French and De Lindo 1982; Tung et al. 1990). This suggests the existence of latent infections (i.e., infected plants that remain asymptomatic), adding further complexity to breeding programs for resistance to bacterial wilt. Latency may be a widespread phenomenon also influenced by the bacterial genotype. For instance, some *R. solanacearum* strains are pathogenic on solanaceae and cucurbits but can colonize and grow latently on banana without causing disease (Wicker et al. 2007). In addition, it is known that wilting symptoms do not always correlate with the amount of bacteria present in the plant (Angot et al. 2006; Hirsch et al. 2002).

To guarantee success of long-term breeding programs, it is extremely important to develop screening methods that allow easy tracking and quantification of bacterial colonization and latency in plants. Fan and colleagues (2008) developed a high-throughput method to evaluate *Pseudomonas syringae* growth in planta by inserting the *luxCDABE* operon in the bacterium, which was used to evaluate more than 100 *Arabidopsis* ecotypes for resistance against this pathogen. In a previous work, *R. solanacearum* YN5 was transformed with a plasmid carrying the *luxCDABE* operon to qualitatively study pathogen colonization in susceptible and resistant tomato (Hikichi et al. 1999). Recently, we showed that the *R. solanacearum* GMI1000 bearing an entire synthetic *lux* operon could be visualized inside infected plants (Monteiro et al. 2012a). An advantage of this system is that the reporter is stably inserted in monocopy in the bacterial chromosome, avoiding reporter loss in competitive conditions (e.g., during plant infection) and variations in reporter copy number. Here, we have improved the reporter system to ensure its continuous expression and introduced it in the highly aggressive *R. solanacearum* UY031 (Siri and Pianzola 2011; Siri et al. 2009), which has been genetically modified for the first time to constitutively emit light while maintaining its virulence on potato. As shown by the data presented here, the modified strain can be efficiently used to follow bacterial multiplication in potato plants. Our results reveal a general correlation of pathogen colonization with disease symptoms and unveil latent infections in symptomless plants. We show that this tool can be used to easily assess the levels of resistance of germplasm collections toward bacterial wilt as well as to study latency.

RESULTS AND DISCUSSION

Generation of a constitutively luminescent UY031 reporter strain.

To allow accurate, high-throughput quantification of bacterial colonization on potato populations, we generated a luminescent variant of *R. solanacearum* UY031, a strain highly aggressive on potato (Siri and Pianzola 2011; Siri et al. 2009). Genetic stability of the luminescent reporter was ensured by using the pRC system, which allows integration of genetic elements in a precise position of the *R. solanacearum* genome (Monteiro et al. 2012b). To guarantee high reporter gene expression in *R. solanacearum*, we cloned the constitutive chloroplast promoter *PpsbA* upstream of the *luxCDABE* operon, creating the delivery plasmid pRCG-Pps-lux. After two steps

of natural transformation and selection of double recombination events (discussed below), we obtained strain UY031 Pps-lux, which carries a *PpsbA::LuxCDABE* fusion accompanied by a gentamicin-resistance cassette inserted downstream of the *GlnS* gene in the chromosome. The integrated sequences were flanked by transcriptional terminators to avoid read-through to and from the neighboring chromosomal regions. UY031 Pps-lux was highly luminescent, as could be visualized by introducing the transformation plates in a light imager (not shown). To verify constitutive expression of the *lux* reporter, the modified strain was grown in liquid culture and both bacterial growth and luminescence were measured at different time points. The correlation between the optical density at 600 nm (OD_{600}) and the luminescence of bacterial cultures is shown in Supplementary Figure S1. To determine the sensitivity of the reporter, cell suspensions of the wild-type UY031 strain or its Pps-lux counterpart carrying the *PpsbA::luxCDABE* reporter fusion were serially diluted 10-fold and luminescence was recorded using a luminometer (Supplementary Table S1). It can be observed from these two experiments that the ratio of light emission (relative luminescence units [RLU]) with respect to cell number remains constant throughout growth and that luminescence can be measured from $OD_{600} = 0.0001$ (i.e., 10^5 cells per milliliter). To further ascertain the effect of different environmental conditions on the expression of the *lux* reporter, we grew the strains in rich or minimal media and measured luminescence and bacterial growth over time. The ratio between light emission and bacterial cell density varied only slightly (20 to 30%) in bacteria growing in both media used (Supplementary Table S2).

Modified UY031 reporter strains are not affected in growth or pathogenicity on potato.

Integration of the foreign genes in the UY031 genome and the high expression of the *lux* reporter could cause a drawback to bacterial fitness. Although gene integration in the homologous region in strain GMI1000 was found to be permissive (Monteiro et al. 2012b), we wanted to ascertain whether the insertion of a constitutively expressed *lux* operon had an impact on the growth or pathogenicity of UY031. We evaluated the pathogenicity of the UY031 Pps-lux strain in comparison with the wild type on potato (Fig. 1A) and on *S. commersonii* (Fig. 1B) by measuring the evolution of wilting symptoms over time after soil inoculation. To better analyze a possible influence of the reporter construct on pathogenicity, the contribution of the *PpsbA* promoter or the *luxCDABE* reporter operon were determined by including strains containing these elements fused to the green fluorescent protein (UY031 Pps-GFP) or to the promoter driving exopolysaccharide expression (UY031 Pep-lux). For better comparison, Figure 1C presents the values corresponding to the area under the disease progress curve (AUDPC), based on the average wilting score for each combination of strain and host. No significant differences in aggressiveness were found between the wild type and the reporter strain ($P = 0.4604$ and 0.2181 for *S. tuberosum* and *S. commersonii*, respectively). These results, together with the fact that the modified strains showed no growth defects in liquid B or minimal medium, demonstrate that the targeted region in UY031 chromosome is a permissive site for integration of genetic constructs and that constitutive expression of the *lux* operon does not affect growth or pathogenicity of the modified *R. solanacearum* strains.

Disease progression can be efficiently evaluated by detecting bacterial light emission in planta.

Once we had created a bacterial reporter strain that constitutively emitted light without affecting virulence, we tested

whether it could be used to measure bacterial colonization on potato. To this end, we soil-drench inoculated the luminescent *R. solanacearum* UY031 Pps-lux strain on *S. commersonii* accessions F97 and F118, which have shown tolerance to bacterial wilt in laboratory assays (Gonzalez et al. 2013; Narancio et al. 2013). Disease symptoms and light emission from the aerial parts of the plants were recorded for up to 7 days after inoculation. Because luminescence detection is a nondisruptive detection method, disease progression could be followed in the same plants over time. Time-course evaluation of luminescence (top panels) and wilting symptoms (lower panels) are shown in a representative, readily colonized plant of each *S. commersonii* accession: F97 (Fig. 2A) and F118 (Fig. 2B). It can be observed that symptom appearance correlated with the extent of light emission, which increased over time. This demonstrated that live imaging of luminescent strains in planta reflects the degree of bacterial colonization, providing a sensitive and reliable method for phenotypical disease evaluation. Interestingly, detection of luminescent (dark) areas using the imaging system frequently preceded symptom appearance, testifying to the higher sensitivity of luminescence to evaluate disease progression compared with visual symptom recordings.

Luminescence detection is not influenced by infection stochasticity.

For any given plant infected with UY031 Pps-lux, progression of luminescence over time always showed a good correlation with external symptoms. However, comparable bacterial loads—as measured by the extent of light-emitting tissue—corresponded to variable symptom severity in different plants. Such an example of different degrees of plant wilting for a similar extent of bacterial colonization is shown in Figure 3. Symptom variability may be attributed to a strong influence of the plant physiological status on wilting development but it could also reflect stochasticity due to the location of the infection. For instance, low infection of various vascular bundles may cause more wilting than extensive colonization limited to a few xylem vessels. Thus, luminescence is a more robust measure of plant colonization, less influenced by the environmental conditions or stochastic variations than visual phenotypic observation of wilting symptoms.

Luminescence can be used to quantify bacterial content inside plant tissues.

In our experiments with the *R. solanacearum* strain carrying the *lux* operon, we often found asymptomatic plants in which

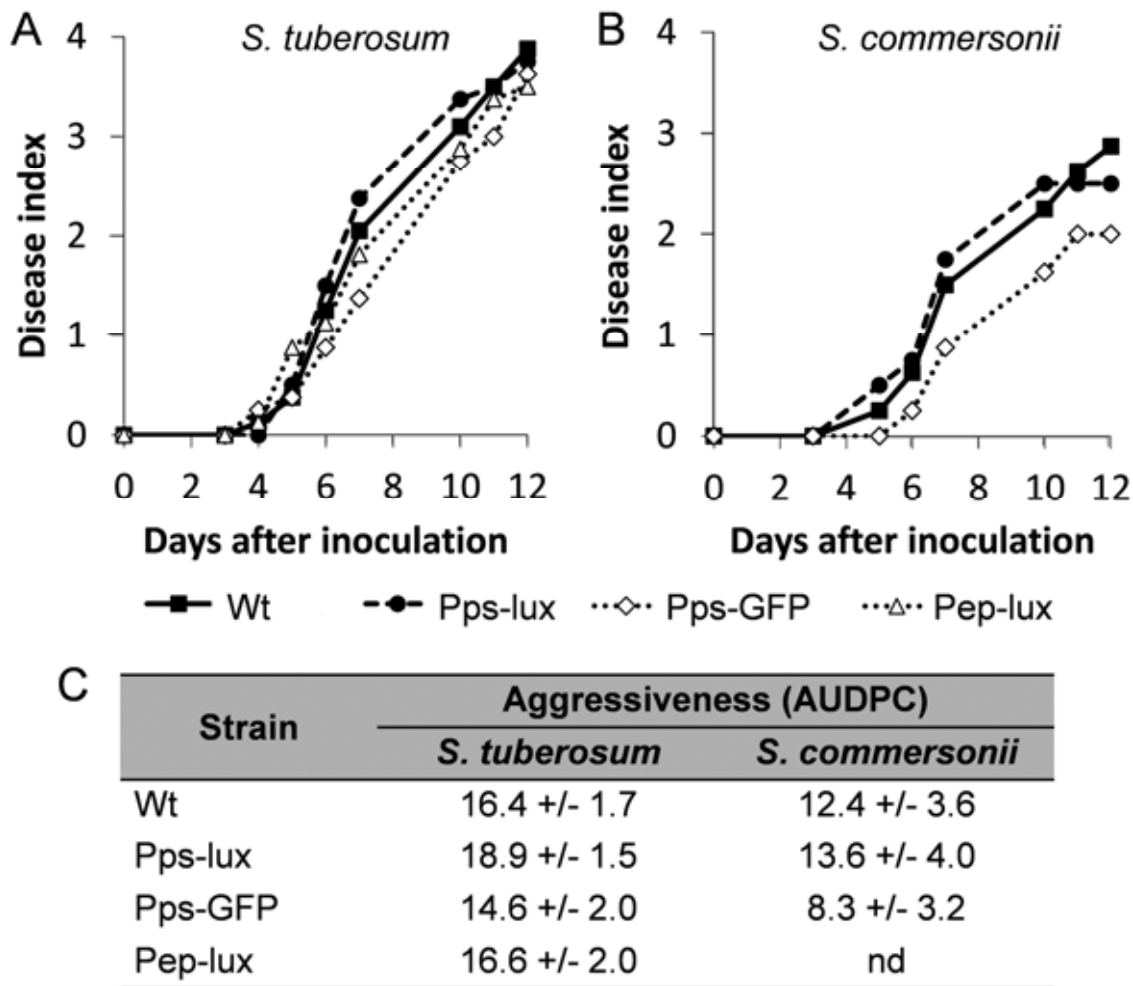


Fig. 1. Aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* reporter strains on potato (*Solanum tuberosum* 'Chieftain') and the wild potato species *S. commersonii* (accession F118). Bacterial wilt progress curves on **A**, *S. tuberosum* Chieftain and **B**, *S. commersonii* after soil inoculation with *R. solanacearum* strain UY031 and its reporter derivative strains UY031 Pps-Lux, UY031 Pps-GFP, and UY031 Pep-lux. Each data point represents the mean of two experiments with four replicates, for a total of eight replicates per strain. **C**, Area under the disease progress curve (AUDPC) for the average wilting rating caused by each strain represented in **A** (*S. tuberosum*) and **B** (*S. commersonii*) \pm standard errors. Values are means of two independent experiments on each host. Data were pooled across trials of repeated experiments because no significant effects involving trials were found in the analyses of variance. No significant differences were observed among AUDPC values for all tested strains ($P = 0.05$); nd = not determined.

bacterial colonization was detected as emission of light from infected stems (Fig. 2A). On some occasions, we identified wilted plants where light-emitting bacteria could not be detected in the aerial part. Examples of this can be observed in Figure 4, displaying *S. commersonii* plants from both the F97 and F118 genotypes with extensive wilting symptoms (80 to 100% wilting) (Fig. 4A) not presenting any bacterial luminescence when exposed to the light imaging system (Fig. 4B). We hypothesized that, similarly to what was observed in the stems, symptoms are more influenced by variability in the location of the infected area. These plants should bear extensive colonization affecting only the underground tissues, which could cause obstruction of the xylem vessels and plant wilting. To test this, we uprooted the wilted plants showing no luminescence in stems and exposed the roots to the light-detection system. Luminescence from the roots was clearly detectable (Supplementary Fig. S2) but could not be correlated with that of the stems, due to the smaller diameter of the roots, which affected sensitivity. To better evaluate pathogen content in the root system and compare it with that of the aerial parts, we harvested sections of the stem and the root

system and measured luminescence quantitatively with a luminometer. Such measurements from tissue sections of the three plants photographed in Figure 4A and B related to their tissue mass are shown in Figure 4C. As expected, high levels of luminescence were detected in the roots, indicating high pathogen content in these tissues. It should also be noted that, although at >10-fold lower levels, luminescence was readily measured in the stem as well, testifying to the high sensitivity of this detection procedure. In order to verify that light emission reflected the amount of bacteria in the plant, we ground tissue sections showing various levels of luminescence and plated dilutions on selective plates. A linear correlation between measured luminescence (RLU values were obtained from 1-ml aliquots) and the corresponding CFU recovered from the same tissues is demonstrated in Supplementary Fig. S3.

The UY031 P_{sb}-lux strain can be used to reveal latent infections.

As mentioned before, latent (i.e., symptomless) infections are a major problem in breeding programs that use symptom

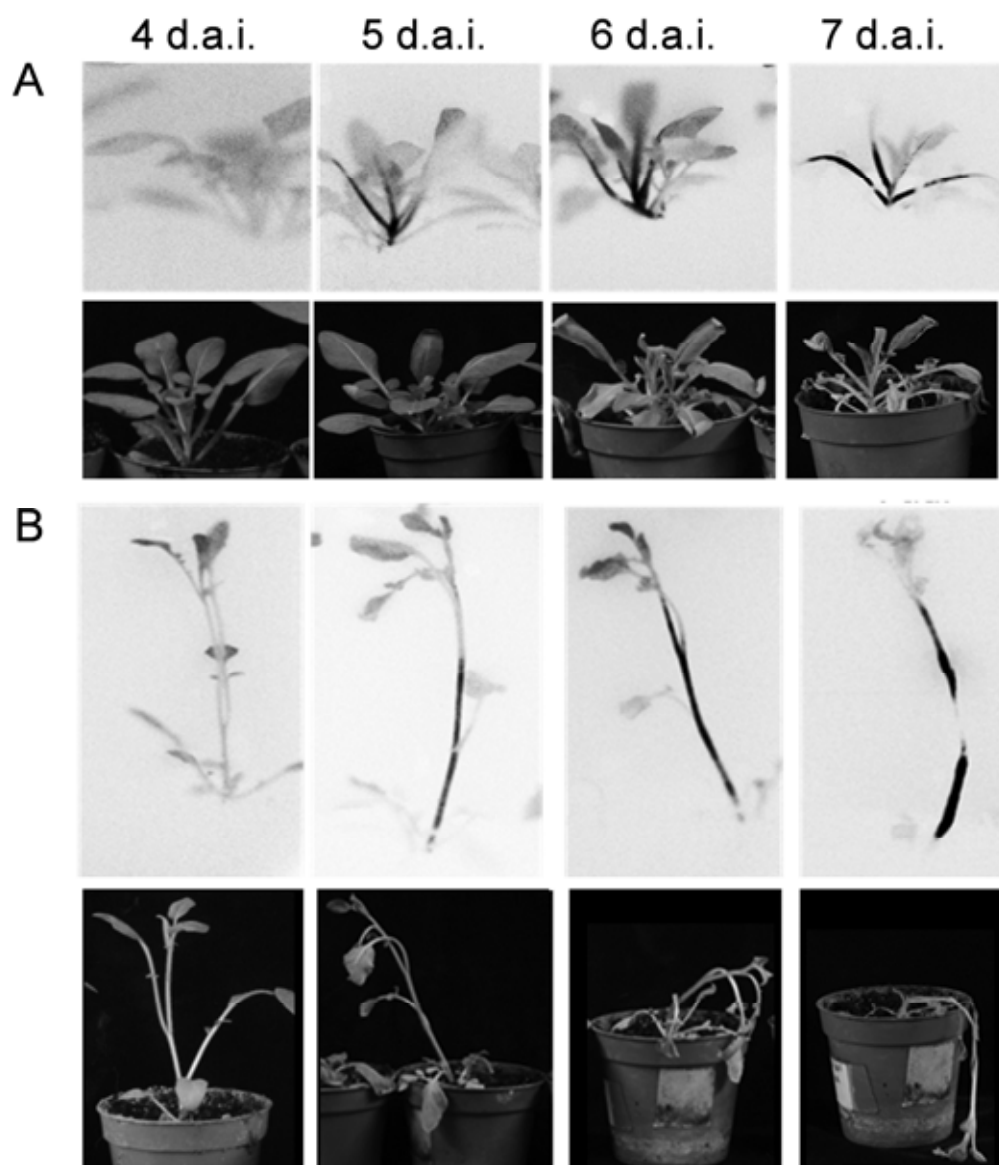


Fig. 2. Time-course evaluation of bacterial wilt on single plants of **A**, F97 and **B**, F118 *Solanum commersonii* accessions inoculated with UY031 P_{ps}-lux. Upper panels show bacterial light emission measured in the dark with a light imaging system using the luminescence detection mode and lower panels show normal light pictures 4, 5, 6, and 7 days after inoculation (dai). Light gray indicates background luminescence due to chlorophyll; black regions are tissue areas colonized by light-emitting bacteria.

scoring as the criterion of selection for resistance to bacterial wilt. Because the newly developed *R. solanacearum* reporter strain could be easily identified in potato stems well before the appearance of external symptoms (Fig. 2), we checked whether latent infections in potato roots could also be detected. We selected *S. commersonii* plants of accession F118 that remained asymptomatic and without bacterial stem colonization at day seven after inoculation (Fig. 5A and B)—a time when most F97 plants were wilted—and the luminescence of root and shoot sections was quantified with a luminometer (Fig. 5C). Bacterial colonization was detected in the root system of some of the symptomless plants by faint but distinct luminescence measures significantly above background levels, set approximately 10 RLU/mg using plants infected with an untransformed strain (Supplementary Fig. S6). In contrast, infection of aerial parts was never recorded in these symptomless plants. Thus, in the conditions used for our pathogenicity assays, latency was typically identified as low bacterial numbers confined to the primary infected tissues. Notice that the pathogen was undetectable in some plants (e.g., F118-9 in Figure 5), consistent with the higher tolerance of the F118 genotype against *R. solanacearum* compared with F97 (discussed below). This absence was confirmed by grinding plant tissue and plating in a selective medium (not shown), which indicates the high sensitivity of the luminometer measurements.

A novel tool to evaluate resistance to bacterial wilt.

To validate the utility of the luminescent strain developed here for evaluation of plant germplasm, we analyzed a number of potato accessions combining the assays described above. We used the previously described *S. commersonii* accessions F118 (tolerant) and F97 (susceptible) but, for better comparison, we also added to the assays another tolerant *S. commersonii*



Fig. 3. Plants with comparable bacterial colonization may show different extents of wilting. Pictures show a light image (top) and luminescence detection (bottom) of two *Solanum commersonii* F97 plants infected with UY031 Pps-lux and displaying contrasting wilting phenotypes. The plant on the left was rated <12% wilting, whereas the right one showed almost 75% wilting. In contrast, light emission capture of plants exposed in the dark showed that the stems of both plants were completely colonized by bacteria.

sonnii accession (F100) and a susceptible commercial potato variety: *S. tuberosum* ‘Chieftain’ (CHF). CHF, F97, F100, and F118 plants were inoculated with the luminescent *R. solanacearum* UY031 Pps-lux strain and wilting symptoms were recorded over time (Supplementary Fig. S4). When plants of the commercial potato cultivar were totally wilted, we selected the remaining symptomless plants (one plant from accession F97, six from F118, and four from F100) and measured luminescence from their aerial tissues (Supplementary Fig. S5) and from their roots. The chart in Figure 6 combines all this information for the different genotypes at 7 days postinoculation: average wilting symptoms in percentage, percentage of plants showing luminescence on the aerial tissues, and percentage of plants showing luminescence on the roots. Consistent with what was expected, the more tolerant genotypes (F100 and F118) clearly showed fewer disease symptoms and less bacterial colonization than the susceptible variants (F97 and CHF). Again, the presence of wilting symptoms always correlated with the presence of bacteria in the aerial tissues detected by luminescence. Interestingly, when luminescence from root tissues was measured with a luminometer, all F100 accession plants showed detectable light emission, indicating latent infections, whereas almost 40% of the F118 plants showed absence of bacteria in the roots. Thus, our method revealed clear differences in latency and resistance among genotypes, proving its utility to assist in breeding programs. Our experiments, performed with a small set of plants, showed that plants of the

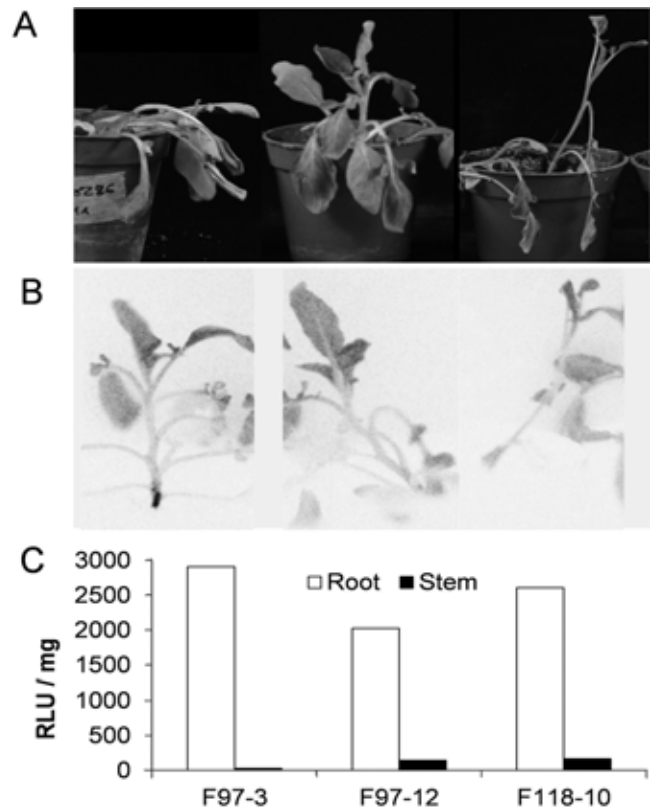


Fig. 4. Bacterial colonization of the root system of wilted plants. **A**, Light picture of *Solanum commersonii* plants of the F97 or F118 accessions exhibiting wilting symptoms at 7 days after inoculation with *Ralstonia solanacearum* carrying the lux operon (UY031 Pps-lux). **B**, UY031 Pps-lux luminescence detection of plants in **A** showing undetectable bacterial colonization throughout the stem. **C**, Bacterial load in the root and the stem of the plants shown above. Plants were uprooted and bacterial abundance estimated by measuring luminescence of cut root or stem sections with a luminometer. Light emission from the reporter strain is presented as relative luminescence units (RLU) per milligram of tissue.

tolerant varieties F100 and F118 carried *R. solanacearum* in the root, a sign of bacterial latency that would go undetected using other germplasm evaluation methods. It is worth noting that we used an aggressive inoculation method, drenching soil with high bacterial concentrations after root damage. The presence of totally resistant F118 plants (i.e., bacteria-free) under these harsh laboratory conditions suggests that F118 or other improved potato accessions may display even higher resistance and lower latency under milder, natural field conditions.

Luminescent bacterial strains to facilitate breeding programs.

The objective of our work was to implement a sensitive, easy-to-use method to quantify bacterial wilt resistance, improving the criteria for selection of promising resistant genotypes in breeding programs. Because tolerant individual plants might have high counts of bacteria without showing symptoms, the luminescent strain described here can be especially suited to better visualize colonization in planta and assist in breeding for resistance toward bacterial wilt. We propose the combined use of luminescence detection and symptom recording to better screen and evaluate resistant genotypes.

The flow chart in Figure 7 summarizes the different steps where a luminescent reporter strain can facilitate the selection procedure. In a first step, germplasm infected with the modified strain is scored by the classical symptom appearance. Once symptomless genotypes are identified, they can be screened for a lack of bacterial colonization in the stems by daily exposition to a light imaging system in a time-course experiment. As shown above, plants selected by this nondisrup-

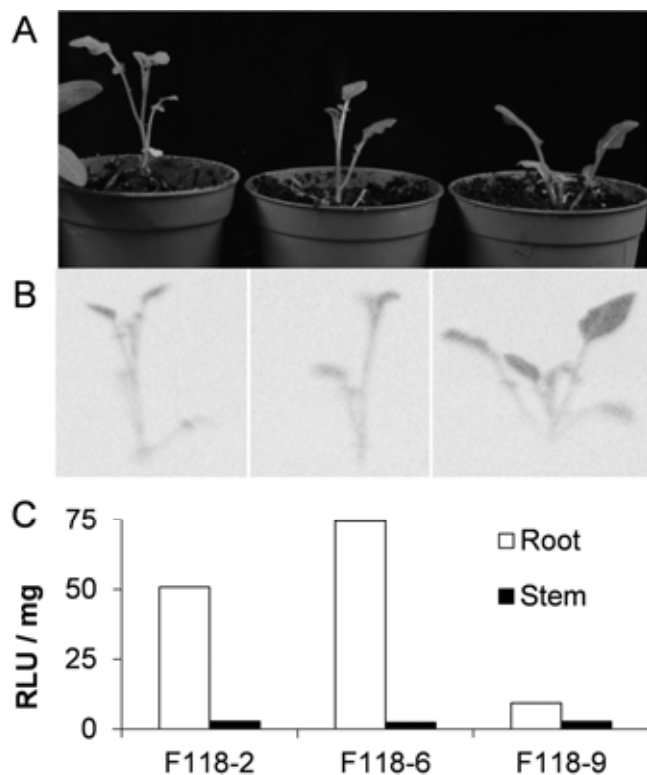


Fig. 5. Bacterial colonization on asymptomatic *Solanum commersonnii* F118 plants. **A**, Light photograph of plants infected with UY031 Pps-lux but showing no wilting at 7 days after inoculation. **B**, Luminescence detection in the aerial parts of the plants in **A**. No signal could be detected throughout the stem. **C**, Bacterial load in plant tissues estimated by exposure of cut root or stem sections from plants in **A** to a luminometer. Light emission from the reporter strain is presented as relative luminescence units (RLU) per milligram of tissue.

tive technique can finally be uprooted and evaluated for latent infections in the roots using the highly sensitive luminometer measurements. All these methodologies are easy to implement, cheap, and fast to carry out because they do not require sophisticated reagents or equipment. In addition, luminescence simplifies the quantification of bacterial counts from infected plants, usually performed by time-consuming tissue homogenization, plating, and counting of CFU.

The work presented here constitutes a proof-of-concept of the potential of using the *luxCDABE* operon in plant–bacteria interactions. Furthermore, the development of this methodology will be useful in breeding programs to analyze potato colonization in a high-throughput and accurate way. This will enable the discarding of tolerant genotypes carrying latent infections at early stages of the selection program, ensuring the success of the process. In addition, the availability of live imaging of bacterial colonization in planta may also be applied in the future to the study of *R. solanacearum* interaction with its hosts to understand basic aspects of this disease.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions.

The *R. solanacearum* reporter strain was constructed using a UY031 wild-type background (phylogroup IIB, sequevar 1), a highly aggressive strain isolated from a potato tuber with typical bacterial wilt symptoms in Uruguay in 2003 (Siri and Pianzola 2011; Siri et al. 2009). *R. solanacearum* was routinely grown at 30°C in rich B medium or Boucher’s minimal medium (MM) supplemented with 20 mM L-glutamate (Sigma-Aldrich, St. Louis) as a carbon source (Boucher et al. 1985; Monteiro et al. 2012a). Tetracycline (at 10 and 5 µg/ml in liquid cultures) and gentamicin (75 and 5 µg/ml in liquid cultures) were used for selection in *R. solanacearum*. *Escherichia coli* (Mach1; Life Technologies, Paisley, U.K.) was

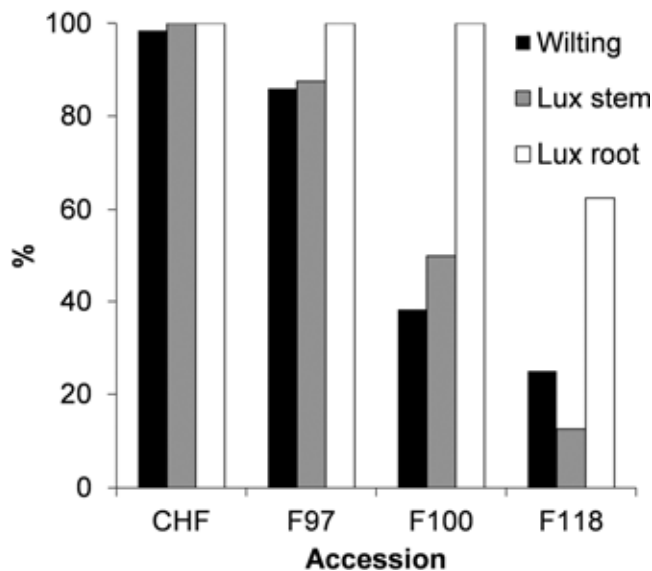


Fig. 6. Evaluation of *Solanum commersonnii* and *S. tuberosum* cultivars for resistance to bacterial wilt using a luminescent bacterial. The susceptible *S. tuberosum* cultivar (‘Chieftain’ [CHF]) and three *S. commersonnii* accessions (susceptible F97 and tolerant F100 and F118) were soil inoculated with strain UY031 Pps-lux and the disease was evaluated at 7 post-inoculation, when all CHF plants were wilted. Black bars indicate the mean percentage of wilting symptoms at day 7, gray bars the percentage of plants in which luminescence was detected in the aerial parts with a light imaging system, and white bars the percentage of plants where light was detected in the roots using a luminometer. Percentages were calculated from the whole set of inoculated plants ($n = 8$) for each genotype.

grown at 37°C in Luria and Bertani broth (LB) (Sambrook et al. 2000). Bacterial growth was monitored by measuring OD₆₀₀.

DNA cloning and integration of constructs into the *R. solanacearum* chromosome.

The chloroplast promoter *PpsbA* was polymerase chain reaction (PCR) amplified from plasmid pDSK-GFPuv (Wang et al. 2007) using primers that added *AvrII* and *KpnI* restriction sites upstream and downstream of the sequence, respectively. This PCR fragment was cloned into pGEM-T-EASY (Life Technologies), giving rise to pG-Pps. The *PpsbA* promoter was then excised from pG-Pps using *AvrII-KpnI* and cloned into the same sites of pRCG-GWY (Monteiro et al. 2012b), creating the plasmid pRCG-Pps-GWY. Finally, to generate pRCG-Pps-lux, an *SfiI-KpnI* fragment containing the entire *LuxCDABE* operon, excised from plasmid pRCGent-Pep-lux (Monteiro et al. 2012b), was cloned into the same sites of pRCG-Pps-GWY. This plasmid bears the *PpsbA::LuxCDABE* reporter fusion and a gentamycin-resistance gene, all flanked by two homology regions for recombination into the bacterial chromosome. Similarly, pRCG-Pps-GFP was created by cloning a *KpnI/BglIII* fragment from plasmid pG-GFPuv (Monteiro et al. 2012b) into the same sites of pRCG-Pps-GWY. PCR amplifications were performed with the proofreading Pfx DNA polymerase (Life Technologies) following the manufacturer's conditions, and other general molecular biology techniques were performed as described by Ausubel and associate (1994).

Genetic elements cloned in pRCG plasmids were introduced into *R. solanacearum* UY031 in a two-step process. First, two homology regions flanking a tetracycline resistance gene born

in pCOMP-PhII (Monteiro et al. 2012b) were inserted via homologous recombination into a permissive site of the UY031 genome after natural transformation using the plasmid linearized by *SspI*. The resulting UY031comp strain contains two sequences in the chromosome where DNA elements carried by pRC plasmids can be targeted by double recombination. A second transformation of the resulting UY031comp strain with linearized pRCG plasmids and selection of double recombination events gave rise to UY031 Pps-lux, UY031 Pps-GFP, and UY031 Pep-lux. *HindIII* was used for linearization of pRCG-Pep-GFP before transformation and *SfiI* for pRCGent-Pep-Lux and pRCG-Pps-lux. *R. solanacearum* natural transformations were performed as described for strain GM11000 (Boucher et al. 1985). Genomic insertions were confirmed by PCR as described by Monteiro and associates (2012b). At least two independent clones were used as biological replicas for all experiments. All plasmids and strains used in this work are summarized in Supplementary Table S3.

Measuring lux reporter expression in culture.

In order to determine whether the constructed strain UY031Pps-lux was able to express constitutively the *lux* reporter, we carried out time-course experiments measuring light emission using a luminometer (Berthold FB 12; Wildbad, Germany) and OD₆₀₀ of the culture using a spectrophotometer (UV-1603 visible spectrophotometer; Shimadzu, Kyoto, Japan). UY031 Pps-lux was grown overnight in rich B medium and diluted in 20 ml of MM in 15- ml flasks to a final OD₆₀₀ of 0.1, and grown at 30°C. Aliquots of the samples (1 ml each) were taken every hour during 7 h to measure OD₆₀₀ and light emission. Luminescence readings were expressed in RLU, which

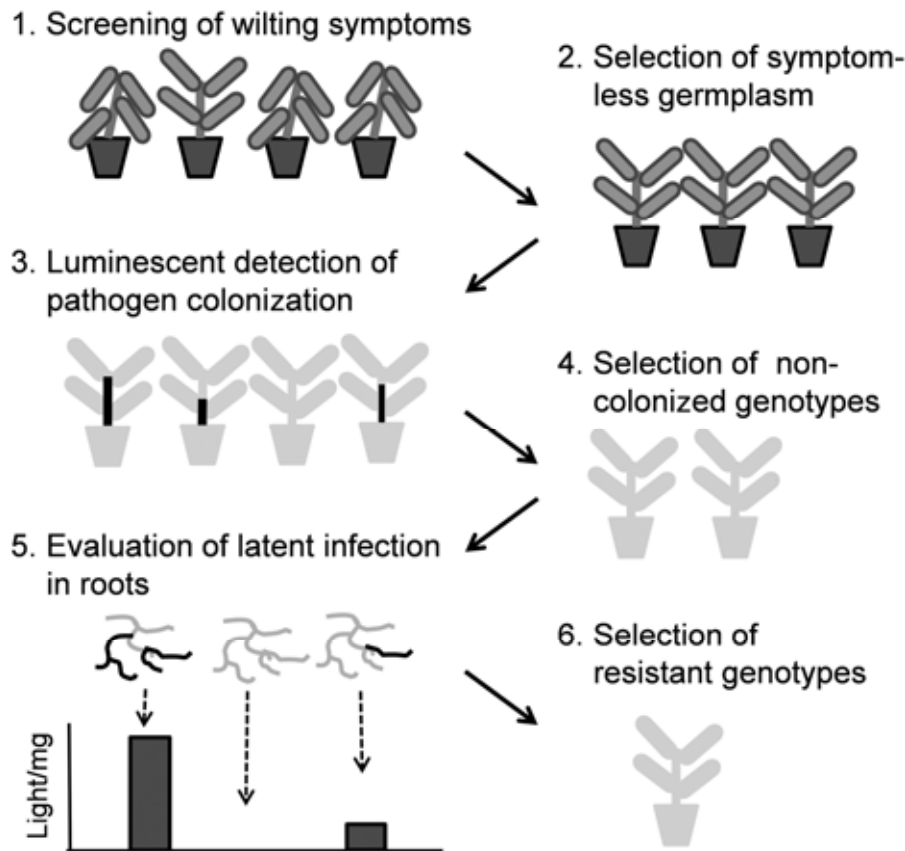


Fig. 7. Scheme of a plant breeding program aided by a luminescent *Ralstonia solanacearum* strain. Step 1: visual screening of wilting symptoms. Step 2: selection of symptomless germplasm. Step 3: use of luminescent *R. solanacearum* strain to detect pathogen colonization in asymptomatic germplasm. Step 4: selection of noncolonized genotypes (stem). Step 5: evaluation of latent infection of roots using the luminescent strain. Step 6: selection of resistant genotypes.

correspond to the direct readings of the apparatus. The background levels of luminescence from untransformed bacteria in solution were approximately 30 RLU, slightly higher than the 10 RLU used as background when luminescence was measured from plant tissues (discussed above).

Plant material and growth conditions.

S. tuberosum CHF (susceptible control) and three F1 plants obtained from a cross between two *S. commersonii* accessions with contrasting resistance against *R. solanacearum* (F97: susceptible, and F100 and F118: tolerant) from the germplasm collection at the National Institute for Agricultural Research (INIA, Las Brujas, Uruguay) (Gonzalez et al. 2013) were used for this study. Plants were micropropagated in vitro from single-node pieces growing on Murashige and Skoog (MS) agar medium supplemented with sucrose at 30 g/liter, and maintained at 22°C with a cycle of 16 h of light and 8 h of darkness. After 2 weeks, plantlets were transferred into pots containing TREF soil mix and grown for 1 week in a greenhouse at 22 to 25°C (50 to 60% relative humidity [RH]) and then for an additional week in a growth chamber at 27°C and 65% RH with a photoperiod of 12 h of light. For long-term (up to 9 months) in vitro maintenance of the *S. commersonii* and *S. tuberosum* clones, plants were kept at 22°C with a cycle of 16 h of light and 8 h of darkness in a preservation medium. Preservation medium contains 20 ml of MS without vitamins, 25 g of sucrose, 40 g of D-sorbitol, 8 g of agar, and pH adjusted to 5.8.

Plant inoculation and disease rating.

Four-week-old plants were drench inoculated with bacterial suspensions. To prepare inocula, bacterial strains were grown overnight in liquid rich B medium (Boucher et al. 1985; Monteiro et al. 2012a) at 30°C with shaking at 200 rpm. Cells were pelleted by centrifugation, suspended in water, and spectrophotometrically adjusted to 10⁷ CFU/ml. Inoculum concentration was confirmed by dilution plating on rich B agar medium. Inoculation was performed by pouring 40 ml of the 10⁷ CFU/ml suspension into each pot. Prior to inoculation, roots were slightly damaged by making three holes in the soil of each pot with a disposable 1-ml pipette tip (2 cm deep).

For disease rating, eight plants were inoculated with each strain in a complete randomized block design in two independent experiments. For bacterial visualization experiments, sets of at least 12 plants were inoculated in parallel in a randomized design in four independent experiments. After inoculation, plants were maintained in a growth chamber at 27 to 28°C (65% RH) with a 12-h photoperiod. Disease development was recorded daily using an ordinal disease index scale ranging from 0 (no wilting symptoms) to 4 (all leaves wilted) for up to 15 days after inoculation (Winstead and Kelman 1952). For comparisons between different strains, pathogenicity was estimated by the AUDPC based on the average wilt scoring for each combination of strain and host. AUDPC data from trials of experiments performed on the same host were combined, and analysis of variance was conducted to identify significant effects of trials, strains, and interactions between the main effects of trials and strains. Means were pooled across trials when no significant effects involving trials were found.

Bacterial visualization and quantification.

Bacteria colonization of the plant tissue was visualized using the Fuji Film LAS4000 light imager system, with the chemiluminescence method, an incremental exposure time of 2 min, and the sensitivity/resolution set to high binning. Because this is a nondestructive technique, plants were evaluated daily until they died. In addition, we indirectly quantified the amount of bacteria present in plants using a destructive method,

by collecting 1-cm sections of the root system or the stem from 1 cm above and below ground and directly measuring luminescence from the cut sections with a luminometer (Berthold FB 12). Each sample was weighted and the luminescence readings were corrected for the amount of tissue present in each sample and expressed in RLU per milligram of tissue. Background luminescence levels were set to 2 RLU by measuring luminescence from plants infected with an untransformed strain.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants SGR0052 and CONES2010-0030 from Comissionat per Universitats i Recerca de the Catalan Government (Generalitat de Catalunya), AGL2010-21870 from the Ministerio de Economía of the Spanish Government, and FMV_2009_1_3045 from the National Research Council in Uruguay (ANII). The work was also partially sponsored by a grant from the Fundació Solidaritat from Universitat de Barcelona. The work was carried out in the framework of project 109AC0373 (Ralstop), funded by the Ibero-American Program for Science Technology and Development (CYTED). V. Ferreira was allowed a travel fellowship from the CYTED project Ralstop and CSIC-Uruguay I+D Grupos 652 grant for a short stay in the lab of M. Valls. We thank L. Gutarra for her advice and for sharing her invaluable experience with us, M. Solé and F. Monteiro for interesting discussions, M. Solé for setting up the potato-*R. solanacearum* pathosystem, I. van Dijk and F. Monteiro for constructing original plasmids (pG-Pps, pRCG-GWY and pRCGent-Pep-lux) used as sources of inserts for cloning, F. Vilaró and M. González for providing the *S. commersonii* genotypes used in this study, and S. Balcells for lending us a luminometer. A. P. Z. Cruz performed most experiments, contributed to the experimental design, data analyses, data interpretation drafting of the article and revised the article critically. V. Ferreira performed the experiments. M. J. Pianzola revised the article critically. M. I. Siri performed experiments, contributed to the data interpretation and revised the article critically. N. S. Coll performed experiments, contributed to the experimental design, data analyses, data interpretation drafting of the article and critical revision of the article. M. Valls performed experiments, contributed to the experimental design, data analyses, data interpretation drafting of the article and critical revision of the article.

LITERATURE CITED

- Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vailleau, F., Baud, C., Gentzbittel, L., Sartorel, E., Genschik, P., Boucher, C., and Genin, S. 2006. *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103:14620-14625.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K. 1994. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, New York.
- Boucher, C. A., Barberis, P. A., Trigalet, A. P., and Demery, D. A. 1985. Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: Isolation of Tn5-induced avirulent mutants. J. Gen. Microbiol. 131:2449-2457.
- Carmeille, A., Caranta, C., Dintinger, J., Prior, P., Luisetti, J., and Besse, P. 2006. Identification of QTLs for *Ralstonia solanacearum* race 3-phyto-type II resistance in tomato. Theor. Appl. Genet. 113:110-121.
- Carputo, D., Aversano, R., Barone, A., Di Matteo, A., Iorizzo, M., Sigillo, L., Zoia, A., and Frusciante, L. 2009. Resistance to *Ralstonia solanacearum* of sexual hybrids between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. Am. J. Potato Res. 86:196-202.
- Caruso, P., Palomo, J. L., Bertolini, E., Álvarez, B., López, M. M., and Biosca, E. G. 2005. Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river: Recovery of stressed cells at low temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 71:140-148.
- Denny, T. P. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. Pages 573-644 in: Plant-Associated Bacteria. S. S. Gnanamanickam, ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Elphinstone, J. G. 2005. The current bacterial wilt situation: A global overview. Pages 9-28 in: Bacterial wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, U.S.A.
- Fan, J., Crooks, C., and Lamb, C. 2008. High-throughput quantitative luminescence assay of the growth in planta of *Pseudomonas syringae* chromosomally tagged with *Photobacterium* luminescence *luxCDABE*. Plant J. 53:393-399.
- Fegan, M., and Prior, P. 2005. How complex is the '*Ralstonia solanacearum*' species complex? Pages 449-461 in: Bacterial Wilt: The Disease

- and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, eds. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, U.S.A.
- French, E. R., and De Lindo, L. 1982. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in potato. Specificity and temperature sensitivity. *Phytopathology* 72:1408-1412.
- Galván, G., Fraguas, F., Quirici, L., Santos, C., Silvera, E., Siri, M., Villanueva, P., Raudivini, L., González, M., Torres, D., Castillo, A., Dalla Rizza, M., Vilaró, F., Gepp, V., Ferreira, F., and Pianzzola, M. J. 2006. *Solanum commersonii*: Una especie con gran potencial para el mejoramiento genético de papa por resistencia a *Ralstonia solanacearum*. Pages 87-102 in: Avances de investigación en recursos genéticos en el cono sur I. I. Prociur, ed. Prociur, Montevideo, Uruguay.
- Genin, S., and Boucher, C. 2004. Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:107-134.
- Genin, S., and Denny, T. P. 2012. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50:67-89.
- Gonzalez, M., Galvan, G., Siri, M. I., Borges, A., and Vilaro, F. 2013. Resistencia a la marchitez bacteriana de la papa en *Solanum commersonii* Dun. *Agrociencia* 17:45-54.
- Hawkes, J. G. 1994. Origins of cultivated potatoes and species relationships. Pages 3-42 in: *Potato Genetics*. J. E. Bradshaw and G. R. Mackay, eds. CAB International, Wallingford, U.K.
- Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 29:65-87.
- Hayward, A. C., and Pegg, K. G. 2013. Bacterial wilt of ginger in Queensland: Reappraisal of a disease outbreak. *Australas. Plant Pathol.* 42:235-239.
- Hikichi, Y., Nakazawa-Nasu, Y., Kitanosono, S., Suzuki, K., and Okuno, T. 1999. The behavior of *lux*-marked *Ralstonia solanacearum* in grafted tomato cultivars resistant or susceptible to bacterial wilt. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 65:597-603.
- Hirsch, J., Deslandes, L., Feng, D. X., Balague, C., and Marco, Y. 2002. Delayed symptom development in *ein2-1*, an *Arabidopsis* ethylene-insensitive mutant, in response to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 92:1142-1148.
- Hong, J., Ji, P., Momol, M. T., Jones, J. B., Olson, S. M., Pradhanang, P., and Guven, K. 2005. *Ralstonia solanacearum* detection in tomato irrigation ponds and weeds. Pages 309-311 in: *Proceedings of the First International Symposium on Tomato Disease*, International Society for Horticultural Science, Orlando, FL, U.S.A.
- Janse, J. D. 1996. Potato brown rot in western Europe—history, present occurrence and some remarks on possible origin, epidemiology and control strategies. *EPPO Bull.* 26:679-695.
- Janse, J. D., van den Beld, H. E., Elphinstone, J., Simpkins, S., Tjou-Tam-Sin, N. N. A., and van Vaerenbergh, J. 2004. Introduction to Europe of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, race 3 in *Pelargonium zonale* cuttings. *Plant Pathol.* 87:147-155.
- Kim-Lee, H., Moon, J. S., Hong, Y. J., Kim, M. S., and Cho, H. M. 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., and Allen, C. 1999. Fertile *Solanum tuberosum* + *S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theor. Appl. Genet.* 98:1272-1278.
- Lebeau, A., Gouy, M., Daunay, M. C., Wicker, E., Chiroleu, F., Prior, P., Frary, A., and Dintinger, J. 2013. Genetic mapping of a major dominant gene for resistance to *Ralstonia solanacearum* in eggplant. *Theor. Appl. Genet.* 126:143-158.
- Martin, C., and French, E. R. 1985. Bacterial Wilt of Potato: *Pseudomonas solanacearum*. International Potato Center, Lima, Peru.
- Monteiro, F., Genin, S., van Dijk, I., and Valls, M. 2012a. A luminescent reporter evidences active expression of *Ralstonia solanacearum* type III secretion system genes throughout plant infection. *Microbiology* 158:2107-2116.
- Monteiro, F., Sole, M., van Dijk, I., and Valls, M. 2012b. A chromosomal insertion toolbox for promoter probing, mutant complementation, and pathogenicity studies in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:557-568.
- Muthoni, J., Shimelis, H., and Melis, R. 2012. Management of bacterial wilt of potatoes: Opportunities for host resistance in Kenya. *J. Agric. Sci.* 4:64-78.
- Narancio, R., Zorrilla, P., Robello, C., Gonzalez, M., Vilaro, F., Pritsch, C., and Dalla-Rizza, M. 2013. Insights on gene expression response of a characterized resistance genotype of *Solanum commersonii* Dun. against *Ralstonia solanacearum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 136:823-835.
- Peeters, N., Guidot, A., Vaillau, F., and Valls M. 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Mol. Plant Pathol.* 14:651-662.
- Pianzzola, M. J., Zarantonelli, L., González, G., Franco Fraguas, L., and Vázquez, A. 2005. Genetic, phytochemical and biochemical analyses as tools for biodiversity evaluation of wild *Solanum commersonii* accessions. *Biochem. Syst. Ecol.* 33:67-78.
- Qian, Y. L., Wang, X. S., Wang, D. Z., Zhang, L. N., Zu, C. L., Gao, Z. L., Zhang, H. J., Wang, Z. Y., Sun, X. Y., and Yao, D. N. 2012. The detection of QTLs controlling bacterial wilt resistance in tobacco (*N. tabacum* L.). *Euphytica* 192:259-266.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- Sequeira, L., and Rowe, P. R. 1969. Selection and utilization of *Solanum phureja* clones with high resistance to different strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Am. J. Potato Res.* 46:451-462.
- Siri, M. I., and Pianzzola, M. J. 2011. Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. *Plant Dis.* 95:1292-1301.
- Siri, M. I., Galván, G. A., Quirici, L., Silvera, E., Villanueva, P., Ferreira, F., Fraguas, L. F., and Pianzzola, M. J. 2009. Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. *Euphytica* 165:371-382.
- Swanson, J. K., Yao, J., Tans-Kersten, J., and Allen, C. 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathology* 95:136-143.
- Tung, P. X., Rasco, E. T., Jr., Vander Zaag, P., and Schmiediche, P. 1990. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato: II. Aspects of host-pathogen-environment interaction. *Euphytica* 45:211-215.
- Wang, J. F., Ho, F. I., Truong, H. T. H., Huang, S. M., Balatero, C. H., Dittapongpitch, V., and Hidayati, N. 2013. Identification of major QTLs associated with stable resistance of tomato cultivar 'Hawaii 7996' to *Ralstonia solanacearum*. *Euphytica* 190:241-252.
- Wang, K., Kang, L., Anand, A., Lazarovits, G., and Mysore, K.S. 2007. Monitoring in planta bacterial infection at both cellular and whole-plant levels using the green fluorescent protein variant GFPuv. *New Phytol.* 174:212-223.
- Wicker, E., Grassart, L., Coranson-Beaudu, R., Mian, D., Guilbaud, C., Fegan, M., and Prior, P. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6790-6801.
- Williamson, L., Nakaho, K., Hudelson, B., and Allen, C. 2002. *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2 strains isolated from geranium are pathogenic on potato. *Plant Dis.* 86:987-991.
- Winstead, N. N., and Kelman, A. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 42:628-634.



Interspecific Potato Breeding Lines Display Differential Colonization Patterns and Induced Defense Responses after *Ralstonia solanacearum* Infection

Virginia Ferreira¹, María J. Pianzola¹, Francisco L. Vilaró², Guillermo A. Galván³, María L. Tondo^{4,5}, María V. Rodríguez⁶, Elena G. Orellano^{4,5}, Marc Valls^{7,8} and María I. Siri^{1*}

¹ Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ² Unidad de Horticultura, INIA Las Brujas, Canelones, Uruguay, ³ Departamento de Producción Vegetal, Centro Regional Sur, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Canelones, Uruguay, ⁴ Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (CONICET-UNR), Rosario, Argentina, ⁵ Área Biología Molecular, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina, ⁶ Área Biología Vegetal (CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina, ⁷ Center for Research in Agricultural Genomics, CSIC, IRTA, UAB, UB, Barcelona, Spain, ⁸ Department of Genetics, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Philippe Prior,
INRA, France

Reviewed by:

Jose Ignacio Ruiz De Galarreta,
NEIKER, Spain
Carlos Alberto Lopes,
Brazilian Agricultural Research
Corporation, Brazil

*Correspondence:

María I. Siri
msiri@fq.edu.uy

Specialty section:

This article was submitted to
Plant Microbe Interactions,
a section of the journal
Frontiers in Plant Science

Received: 30 June 2017

Accepted: 02 August 2017

Published: 28 August 2017

Citation:

Ferreira V, Pianzola MJ, Vilaró FL,
Galván GA, Tondo ML,
Rodríguez MV, Orellano EG, Valls M
and Siri MI (2017) Interspecific Potato
Breeding Lines Display Differential
Colonization Patterns and Induced
Defense Responses after *Ralstonia
solanacearum* Infection.
Front. Plant Sci. 8:1424.
doi: 10.3389/fpls.2017.01424

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is one of the main hosts of *Ralstonia solanacearum*, the causative agent of bacterial wilt. This plant pathogen bacteria produce asymptomatic latent infections that promote its global spread, hindering disease control. A potato breeding program is conducted in Uruguay based on the introgression of resistance from the wild native species *S. commersonii* Dun. Currently, several backcrosses were generated exploiting the high genetic variability of this wild species resulting in advanced interspecific breeding lines with different levels of bacterial wilt resistance. The overall aim of this work was to characterize the interaction of the improved potato germplasm with *R. solanacearum*. Potato clones with different responses to *R. solanacearum* were selected, and colonization, dissemination and multiplication patterns after infection were evaluated. A *R. solanacearum* strain belonging to the phylotype IIB-sequevar 1, with high aggressiveness on potato was genetically modified to constitutively generate fluorescence and luminescence from either the green fluorescence protein gene or *lux* operon. These reporter strains were used to allow a direct and precise visualization of fluorescent and luminescent cells in plant tissues by confocal microscopy and luminometry. Based on wilting scoring and detection of latent infections, the selected clones were classified as susceptible or tolerant, while no immune-like resistance response was identified. Typical wilting symptoms in susceptible plants were correlated with high concentrations of bacteria in roots and along the stems. Tolerant clones showed a colonization pattern restricted to roots and a limited number of xylem vessels only in the stem base. Results indicate that resistance in potato is achieved through restriction of bacterial invasion and multiplication inside plant tissues, particularly in stems. Tolerant plants were also characterized by induction of anatomical and biochemical changes after *R. solanacearum* infection,

including hyperplastic activity of conductor tissue, tylose production, callose and lignin deposition, and accumulation of reactive oxygen species. This study highlights the potential of the identified tolerant interspecific potato clones as valuable genetic resources for potato-breeding programs and leads to a better understanding of resistance against *R. solanacearum* in potato.

Keywords: bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*, potato, *Solanum commersonii*, plant breeding, disease resistance, latent infections

INTRODUCTION

Potato (*Solanum tuberosum* L.) is the third most important food crop after rice and wheat. Potato is a staple food for more than a billion people worldwide, and the global production of this crop is more than 300 million metric tons (FAOSTAT, 2014). The origin of commercial potato cultivars is limited to a restricted number of potato clones introduced from South America into Europe in the 16th century, leading to a narrow genetic base and a limited resistance to pathogens (Hooker, 1981).

Among the bacterial potato diseases, bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* ranks the first. The disease affects more than 1.5 million hectares of potato crops worldwide having a significant economic impact estimated at \$ 950 million per annum (Elphinstone, 2005). *R. solanacearum* is within the top 10 plant pathogenic bacteria because of its lethality, persistence in the environment, wide host range and broad geographic distribution (Elphinstone, 2005; Mansfield et al., 2012). This soil-borne vascular pathogen affects more than 250 monocot and dicot species in tropical, subtropical and temperate regions (Peeters et al., 2013). The bacterium infects the roots of host plants, rapidly colonizes the vascular system and releases large amounts of exopolysaccharide that prevent water flow within xylem vessels, causing wilting symptoms and subsequent plant death (Genin and Denny, 2012). *R. solanacearum* can persist, spread, and survive in different natural habitats including soil, water, and plant tissues. These outstanding multifaceted characteristics mirror the extraordinary genetic and phenotypic diversity of this xylem-invader, making difficult to achieve a sustainable disease control (Lebeau et al., 2011).

Ralstonia solanacearum is a species complex composed by a diverse group of strains classified in four phylotypes based on their phylogeography. Each phylotype is further subdivided in sequevars defined as groups of isolates with highly conserved DNA sequences (Fegan and Prior, 2005). A recent taxonomic revision has led to the distinction of three separate species within the species complex (Safni et al., 2014). In this new classification, the species *R. solanacearum* includes only strains from phylotype II with origin in South America. The novel species *R. pseudosolanacearum* was defined to include strains from phylotypes I and III, and strains from phylotype IV were assigned to the species *R. syzygii* (Safni et al., 2014). In Uruguay, as well as in other cold and temperate regions of the world, potato crops are mainly affected by *R. solanacearum* strains from the phylotype IIB, sequevar 1 (Siri et al., 2011).

The most economical, environmentally friendly, and effective way to control bacterial wilt in various crops relies in the use

of cultivars with resistance (Boshou, 2005; Huet, 2014). Wild *Solanum* species and primitive forms of cultivated potato are considered an invaluable and diverse source of genetic variation for potato breeding for resistance to different pests and diseases (Machida-Hirano, 2015). Potato stands out among all other crops considering the genetic diversity and potential of available germplasm for breeding purposes. Bacterial wilt resistance sources have been identified in several tuber-bearing cultivated and wild *Solanum* species including *S. phureja*, *S. stenotomum*, *S. acaule*, *S. bulbocastanum*, *S. clarum*, *S. chacoense*, and *S. commersonii* (Machida-Hirano, 2015). However, the resistance from these sources was variable depending on pathogen strain and environmental conditions, making breeding potato for bacterial wilt resistance challenging (Patil et al., 2012). Although some potato varieties with moderate to highly levels of bacterial wilt resistance were released, dragging undesirable agronomic traits together with the occurrence of latent infections in tubers are still major problems (Huet, 2014). Progress obtained so far shows that bacterial wilt resistance available in *Solanum* wild species has not been fully exploited, suggesting that diversifying the genetic basis for both disease resistance and agronomical traits is a challenge for potato breeding programs.

Solanum commersonii Dun is a tuber-bearing wild species with high potential as bacterial wilt resistance source for potato breeding. This species is widely distributed and adapted to our environmental conditions and harbors many desirable traits, including cold tolerance, and resistance to several diseases including bacterial wilt (Laferriere et al., 1999; Carputo et al., 2009; Siri et al., 2009). Introgression of resistance through the potato breeding program in Uruguay makes use of the high genetic diversity available in this wild species (Pianzola et al., 2005; Siri et al., 2009). The breeding scheme involves conventional interspecific crosses exploiting the occurrence of non-reduced gametes and using *S. phureja* as a bridge species, to overcome crossing barriers between *S. commersonii* and the cultivated potato. Selected F1 hybrids from *S. commersonii* × *S. phureja* progenies were backcrossed with the cultivated potato to obtain the so-called BC1 and recurrent backcross generations were obtained after crossing BC1 plants with *S. tuberosum* genotypes (Gaiero et al., 2017). These backcrosses have resulted in advanced interspecific clones with high bacterial wilt resistance and low frequency of latent infections (unpublished data).

Knowledge on pathogen distribution and multiplication in plant tissues is critical to fully exploit potential of sources of bacterial wilt resistance through breeding programs. Bacterial wilt disease progress was previously described in susceptible

and resistant tomato genotypes suggesting that resistance in this crop is related with limitation of bacterial spread in the stems (Grimault and Prior, 1993; Grimault et al., 1994a; Nakaho et al., 2004). Physical barriers including tyloses production and cell wall reinforcement were found to play important functions in preventing *R. solanacearum* dissemination in vascular tissues (Grimault et al., 1994b; Nakaho et al., 2000). In a recent study, bacterial wilt resistance in tomato plants was not attributed to a limited bacterial movement in the stems but to restriction of root colonization by the pathogen (Caldwell et al., 2017). In resistant tomato cultivars, a delay in colonization of the root vascular cylinder was found, and once bacteria enter the root vascular tissue, colonization in the vasculature was spatially restricted (Caldwell et al., 2017).

In contrast, little knowledge is available regarding defense responses in potato, and the infection process in resistant sources is not well understood. Recently, transcriptomics studies have been conducted in resistant *S. commersonii* genotypes, allowing the identification of hundreds of candidate genes proposed to be involved in resistance to bacterial wilt in this wild species (Narancio et al., 2013; Zuluaga et al., 2015). Previously we developed a new screening approach to follow pathogen colonization in potato germplasm by live imaging using a luminescent *R. solanacearum* reporter strain (Cruz et al., 2014). This method allows the detection of latent infections in roots and stems tissues of asymptomatic tolerant plants and was proposed as an efficient tool for resistance screenings in potato breeding programs (Cruz et al., 2014). Here, we extend this approach to evaluate in detail the *R. solanacearum* colonization, dissemination and multiplication pattern in selected potato clones with contrasting levels of bacterial wilt resistance. In addition, we used an additional reporter strain that generate fluorescence from a synthetic green fluorescence protein (GFP) gene integrated in the bacterial chromosome. Both reporter strains were used for direct and precise visualization of fluorescent and luminescent cells in plant tissues by confocal microscopy and luminometry. To gain a better understanding of this host-pathogen interaction, induced plant defenses responses were also evaluated, including callose and lignin deposition and reactive oxygen species production.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Growth Conditions

Ralstonia solanacearum reporter strains UY031 Pps-lux and UY031 Pps-GFP were constructed and validated previously by our group (Cruz et al., 2014). The reporter systems (*LuxCDABE* operon and GFP) were introduced in a neutral genome region of *R. solanacearum* UY031, a phylotype IIB- sequevar 1 strain isolated from potato crops in Uruguay, that shows high levels of aggressiveness (Siri et al., 2011; Guarischi-Sousa et al., 2016). Reporter strains and UY031 were grown on triphenyltetrazolium chloride medium (Kelman, 1954) and incubated at 28°C for 48–72 h. Gentamicin was used for selection of reporter strains (5 and 75 µg·ml⁻¹ in liquid and solid cultures, respectively).

Optical density was measured spectrophotometrically at 600 nm to adjust bacterial suspensions for inoculation (OD₆₀₀ of 0.1 corresponds to 10⁸ cfu·ml⁻¹).

Plant Materials and Growth Conditions

Four interspecific potato clones (13001.79, 13001.107, 11201.27, and 09509.6) derived from different breeding lines were selected from the National Institute for Agricultural Research (INIA, Uruguay) germplasm collection. Introgression of resistance to *R. solanacearum* from diverse wild *S. commersonii* accessions was achieved using *S. phureja* as a bridge species followed by successive backcrosses to *S. tuberosum* (Gaiero et al., 2017). The potato cultivar *S. tuberosum* cv. Chieftain was used as a susceptible control. Plants were micro-propagated *in vitro* from a node in Murashige and Skoog (MS) medium with sucrose 30 g/l and kept at 22°C with cycles of 16 h light/8 h darkness. After 3 weeks plants were sown in plastic boxes with soil mix (Tref Substrates BV, Moerdijk, Netherlands) and grown for 1 week in a greenhouse under natural light. Then, plants were placed in a growth chamber at 24°C and 65% relative humidity with a photoperiod of 16 h light/8 h darkness for one additional week prior to inoculation assays.

Plant Inoculation

Bacterial suspensions were prepared from overnight liquid cultures of *R. solanacearum* wild type UY031 and reporter strains incubated at 28°C, and spectrophotometrically adjusted to a concentration of 10⁷ cfu·ml⁻¹.

For bacterial wilt resistance evaluation, potato clones grown in 88-well seedbeds were soil inoculated using 1 ml of bacterial suspension of strain UY031 to reach a final density of 10⁶ cfu·g⁻¹ (Siri et al., 2011). Plants inoculated with saline solution were considered as the negative control treatment. Two replicate trays containing eight plants each were inoculated for each clone using a completely randomized design and the experiment was performed twice. Disease progression was registered regularly until 28 days after inoculation using a scale ranging from 0 (asymptomatic plant) to 4 (all leaves wilted). The resistance level was calculated by the area under disease progress curve (AUDPC) based on the average wilt scoring for each clone. To determine the occurrence of latent infections 2-cm stem sections from asymptomatic plants were ground, streaked onto mSMSA plates (Elphinstone et al., 1996) and incubated at 28°C for 5–7 days. Asymptomatic plants were recorded as latently infected when typical *R. solanacearum* colonies were detected on the mSMSA plates.

To follow infection process, potato clones were inoculated with *R. solanacearum* reporter strains UY031 Pps-lux or UY031 Pps-GFP. Plants grown in individual pots were soil inoculated by drenching 40 ml of the bacterial suspensions into each pot to reach a final density of 10⁶ cfu·g⁻¹. Roots were wounded before inoculation as described by Cruz et al. (2014).

For evaluation of histological effects caused by *R. solanacearum* infection, the susceptible potato cultivar Chieftain and the tolerant clone 09509.6 were soil or stem inoculated using wild type strain UY031. For stem inoculation assays, a drop (10 µl) of the bacterial suspension (10⁷ cfu·ml⁻¹)

was placed at the petiole of the third expanded leaf counting from the top of the plant, and then wounded with a needle to favor bacterial penetration. Soil inoculation was performed as described above using plants grown in individual pots. All experiments were performed using three to five replicate plants for each genotype.

All inoculation assays were performed in a growth chamber at 28°C with 65% relative humidity and a photoperiod of 16 h light: 8 h darkness.

Bacterial Visualization and Quantification

In Planta

For luminescence detection, plants from clones 13001.79, 13001.107, 11201.27 and Chieftain were soil inoculated using strain UY031 Pps-lux as described above. Two independent experiments were performed using six replicate plants of each clone arranged in a complete randomized design. After inoculation, bacterial cells were detected daily in plant tissues for 6 days after inoculation using the Fuji Film LAS4000 light imager system, using the same setting conditions as described by Cruz et al. (2014). In addition, luminescence was quantified in a luminometer (Berthold FB 12) from roots and 2-cm stem segments from the basal and the aerial part of the plants. Luminescence readings were expressed as RLU per milligram of fresh tissue (Cruz et al., 2014).

For fluorescence detection, plants from clones 13001.79, 13001.107, 11201.27, 09509.6 and Chieftain were soil inoculated with the reporter strain UY031 Pps-GFP and bacteria was detected in root and stems tissues 2 and 7 days post inoculation. Several experiments with different combinations of clones were performed using three to five replicate plants for each combination of clone/time arranged in a complete randomized design. Each clone was assessed in at least two independent experiments. Stems and roots were weighed and washed with tap water, disinfected with sodium hypochlorite 1% for 1 min, washed again and dried with sterile absorbent paper. Using a previously disinfected scalpel, 2-cm stem segments were cut from 1 cm above ground. Six to 10 cross-sections were made by hand on the end of each stem segment and the remaining sample was ground and used for bacteria quantification by plate counting on triphenyltetrazolium chloride agar medium (Kelman, 1954) supplemented with gentamicin. Whole root systems were observed using an epifluorescence microscope with GFP filter (Nikon, Eclipse 80i) to locate the areas where the bacterium was present. Colonized roots were selected to be observed by confocal microscopy. Stem cross-sections and selected roots from each plant were placed on a glass slide, surrounded with solid vaseline and covered with agarose 1% used as immersion medium. Samples were observed using a confocal microscope (Leica, TCS SP5).

Differential Staining of Stems

Cross-Sections

Safranin-Fast Green Stain

Anatomical features of control and infected seedlings from the tolerant clone 09509.6 and the susceptible potato cultivar

Chieftain were investigated by means of differential stains and analysis under a light microscope. Fresh plant material was fixed in FAA solution (50% ethanol, 5% glacial acetic acid, 30% formaldehyde and 15% water), dehydrated in an increasing ethanol and ethanol/xylene concentrations solutions and embedded in paraffin (Johansen, 1940). Cross sections of 10 µm were obtained with a Minot microtome. Sections were stained with safranin-fast green (Strittmatter, 1979), mounted in Canada Balsam Natural (Biopack) and observed using a light microscope (Axiolab, Zeiss MC 80).

Callose Detection

The detection of callose deposits was made harvesting plants 48 h after stem inoculation and cleaned during a whole night in 96% ethanol in Petri dishes. Once the stems were completely destained, they were cut manually and were incubated first in sodium phosphate buffer (0.07 M, pH 9) for 30 min, and then in aniline blue solution (0.05%) for 60 min (Daurelio et al., 2009). Finally, the samples were mounted in glycerol-water mix (50%) and observed immediately using an UV-fluorescence microscope (MIKOKA F320 with mercury lamp power box).

ROS Detection

Stem inoculation assays using UY031 strain were performed on the tolerant clone 09509.6 and susceptible cultivar Chieftain. Three clonal replications of each genotype were inoculated with the bacterial suspension, and negative plant controls were inoculated using sterile saline solution. Stems were harvested 24 h after inoculation and stained with DAB-HCl for 18 h in darkness. Then stems were placed in 96% ethanol to destain (Daurelio et al., 2009). Once the stems were completely destained, they were cut in cross sections. Reactive oxygen species (ROS) were detected using a light microscope (Zeiss MC 80, Axiolab).

Data Analysis

Analysis of variance (ANOVA) and the Tukey's multiple comparison test were applied with a 95% confidence level to analyze AUDPC, luminescence and plate counts values. Model residuals were used to check for the assumptions of normality and homogeneity of variances. Data from replicate trials of experiments were combined when there were no significant effects among trials. All statistical analyses were done using Infostat (Di Rienzo et al., 2009).

RESULTS

Selected Potato Clones Were Classified As Susceptible or Tolerant Based on Wilting Scoring and Occurrence of Latent Infections

Experimental conditions used for resistance evaluation were favorable for distinguishing different levels of bacterial wilt resistance among the selected interspecific clones (Table 1). As expected, the potato cultivar Chieftain showed a highly susceptible response, with first symptoms appearing 5–7 days

TABLE 1 | Bacterial wilt responses of selected potato genotypes expressed as the area under disease progress curve (AUDPC) and pathogen detection in stem tissues of asymptomatic plants 28 days post inoculation.

Genotype	Description ^a	AUDPC ^b	Stem latent infection ^c	Plant reaction
cv. Chieftain	tbr	62,6 A	–	Susceptible
13001.79	(cmm × cmm)	48,5 A	–	Susceptible
13001.107	(cmm × cmm)	17,1 B	+	Tolerant
11.201.27	(cmm × phu) × tbr	23,9 B	+	Tolerant
09.509.6	[(cmm × phu) × tbr] × tbr	15,8 B	+	Tolerant

^aPedigree of each potato genotype. cmm: *Solanum commersonii*, phu: *Solanum phureja*, tbr: *Solanum tuberosum*.

^bAUDPC values are means of two repeated experiments with two replicate trays containing eight plants of each genotype. Data were pooled across experiments since no significant effects involving trials were found in the analyses of variance (ANOVAs). Values followed by the same letter in the same column are not significantly different (Tukey's multiple comparison test, $P = 0.05$).

^cStem latent infection was evaluated in asymptomatic plants 28 days after inoculation with *Ralstonia solanacearum*. (+): growth of typical *Ralstonia solanacearum* colonies in mSMSA plates. (–): no evidence of *Ralstonia solanacearum* growth in mSMSA plates.

after inoculation and all plants completely wilted at the end of the experiment (data not shown). Based on comparison of AUDPC data, the clone 13001.79 was classified as susceptible, as only a low proportion (5–20%) of plants remained asymptomatic 28 days after inoculation in the repeated experiments. The other selected clones (13001.107, 11201.27, and 09509.6) showed significant differences in symptom progression compared to the susceptible control. For these genotypes asymptomatic plants predominated (>70%), and the pathogen was detected at the basal part of the stems revealing the occurrence of latent infections. Consequently, these clones were classified as tolerant.

Tolerant Clones Showed a Restricted Colonization Pattern in Roots and Stem Base

Plants of Chieftain and 13001.79 showed wilting symptoms 6 days after inoculation and the pathogen could be detected *in planta* as dark zones along the stem (Figures 1A,B). In contrast, plants of tolerant clones remained asymptomatic and bacterial colonization was observed only in the lower stem (collar) from day fourth after inoculation (Figures 1C,D). Luminescence emitted by UY031 Pps-lux strain 6 days after inoculation in infected plant tissues is shown as relative luminescence units (RLU) per milligram in Figure 2.

The tolerant clone 09509.6 displayed higher luminescence values in roots than the cultivar Chieftain ($P = 0.0277$), and clones 13001.79 and 13001.107 showed an intermediate response. In the lower stem (collar) both susceptible genotypes (13001.79 and Chieftain) showed higher bacterial loads than tolerant clones (13001.107 and 11201.27) ($P = 0.0014$). Luminescence was also measured in upper stems where the susceptible cultivar Chieftain showed the highest colonization level, while the other genotypes displayed luminescence values just above the background level.

Ralstonia solanacearum Multiplied in a Limited Number of Xylem Vessels and Reached Low Population Densities in Stems of Tolerant Plants

Two days after inoculation with the UY031 Pps-GFP reporter strain all plants remained asymptomatic (Figure 3), and the pathogen was not observed by microscopic evaluation neither in stems nor in roots. Five days later, wilting symptoms were evident only in susceptible plants (Chieftain and 13001.79) (Figure 3). At this time point bacterial colonization was verified in roots systems of all plants compared with mock inoculated roots of each variant. Representative images showed the same distribution pattern in roots of susceptible and tolerant clones (Supplementary Figure 1). A high frequency of wounded roots was observed highlighting the severity of the inoculation procedure.

On the contrary, differences in colonization patterns were observed among stems of susceptible and tolerant plants. In mock inoculated plants, stem sections were typically observed as few autofluorescent patches and representative xylem vessels identified by their roughly octagon shaped lignified cell walls (Figure 4A). Microscopic evaluation of susceptible plants with visible wilting symptoms showed a heavy colonization 7 days post inoculation. Bacteria was found in the vascular and parenchymatic tissues and distributed throughout the apoplast (Figures 4B,C). In contrast, representative images of asymptomatic plants from the tolerant clone 11201.27, showed bacterial cells occluding a limited number of xylem vessels within only one of the vascular bundles (Figure 4D). This restricted distribution may be associated with a reduced interference of water transport explaining the typical absence of wilting symptoms in this clone. For other tolerant clones (13001.107 and 09509.6) all plants remained asymptomatic and no bacterial cells were observed in the transverse sections of stems by confocal microscopy (data not shown).

Microscopy provides valuable qualitative observations but is not sensitive enough and does not allow quantification. Hence, the same roots and stems samples were also used for quantitative analysis of pathogen colonization by plate counting. Two days after inoculation roots from all clones were already colonized by the pathogen, although microscopic evaluations failed to detect *R. solanacearum* cells in plant tissues (Figure 5). No significant differences were observed among pathogen densities in roots of all tested clones 2 and 7 days post inoculation. However, susceptible plants showed higher bacterial loads in stems compared to plants from the tolerant clones. In plants from the susceptible cultivar Chieftain and clone 13001.79, *R. solanacearum* multiplied extensively in the stems, and quickly increased to 10^6 cfu·g⁻¹ 2 days after inoculation and reached more than 10^9 cfu·g⁻¹ 7 days after inoculation. In tolerant clones (13001.107, 11201.27, and 09509.6), there was no apparent increase in *R. solanacearum* population in stems from 2 to 7 days after inoculation. This is consistent with the fact that no wilting symptoms were observed in these plants throughout the study. In these clones, bacterial titers in stems tissues reached

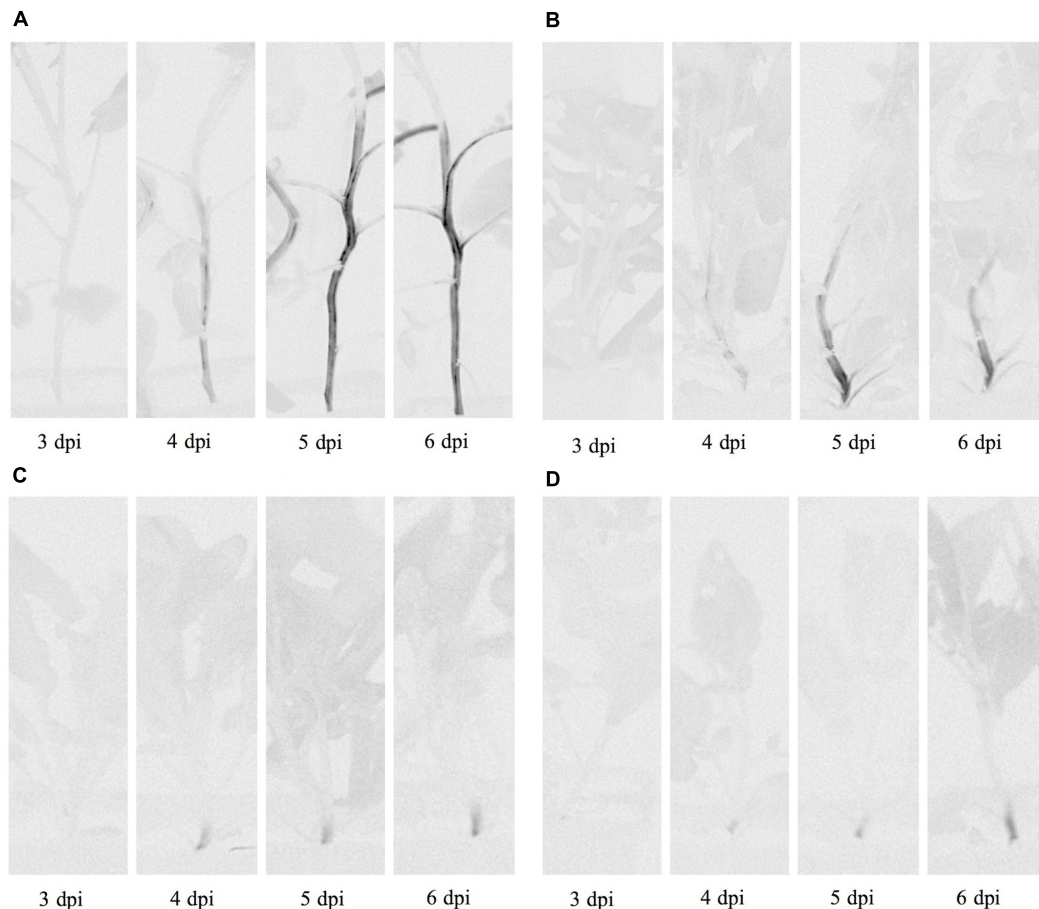


FIGURE 1 | Bioluminescence imaging of *Ralstonia solanacearum* strain UY031 Pps-lux colonization pattern in different potato genotypes. **(A)** Susceptible potato cultivar *Solanum tuberosum* cv. Chieftain. **(B)** Susceptible potato clone 13001.79. **(C)** Tolerant potato clone 13001.107. **(D)** Tolerant potato clone 11201.27. Images were acquired 3, 4, 5, and 6 days post inoculation (dpi) using an *in vivo* imaging system. Light gray indicates background luminescence due to chlorophyll and black regions are tissue areas colonized by light-emitting bacteria.

an average of 10^4 cfu·g⁻¹, which is probably below the required levels for disease development.

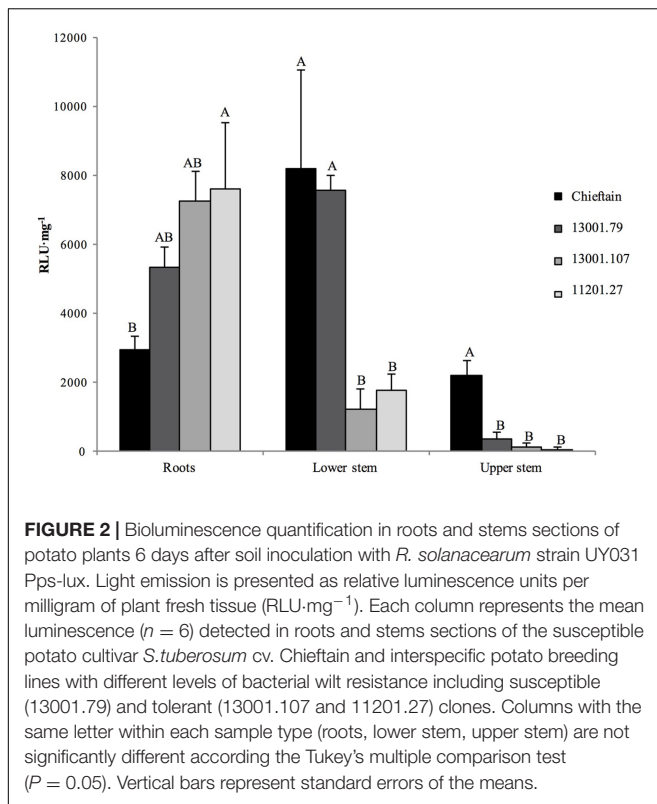
Histological Effects of *R. solanacearum* Infection in Susceptible and Tolerant Potato Plants

Cell division with the generation of increased quantity of conductor tissue (xylem and phloem) was observed strongly in infected plants of the tolerant clone 09509.6 (**Figure 6D**). The susceptible cultivar Chieftain also showed hyperplastic activity after *R. solanacearum* infection but to a lesser extent (**Figure 6C**). Mock inoculated controls are shown in **Figures 6A,B**. In addition, stems from clone 09509.6 presented the highest level of lignification, with an increased thickening of xylem vessels compared to the susceptible cultivar Chieftain. This was revealed by staining with safranin which dyes secondary cell walls red (**Figures 6E,F**). Representative images of thin sections of infected stems from clone 09509.6 also revealed the existence of vessels plugged by tyloses with a globular shape (**Figure 6F**). This result

suggests that infected xylem vessels could induce these structures to occlude the vascular system in tolerant plants limiting bacterial flow to upper tissues. In mock inoculated or susceptible plants no tylose production was observed.

Callose was localized using aniline blue solution leading to yellow fluorescence (**Figure 7**). In infected plants from the susceptible cultivar Chieftain pads of callose were observed filling the sieve tubes in phloem tissue and in areas of cellular communication between cortical parenchyma cells (**Figures 7A,C,E**). Callose deposits were not observed in mock inoculated plants (data not shown). In the tolerant clone 09509.6 callose was abundant in both healthy and infected plants, and was located filling the sieve tubes in the phloem tissue (**Figures 7B,D,F**). In infected plants of this clone the increased quantity of conductor tissue due to induced hyperplastic activity was revealed as strong autofluorescence of the lignified tissue (**Figure 7D**).

Diamino benzidine (DAB) formed a brown precipitate with hydrogen peroxide that was correlated with production of ROS (**Figure 8**). In susceptible cultivar Chieftain no differences were

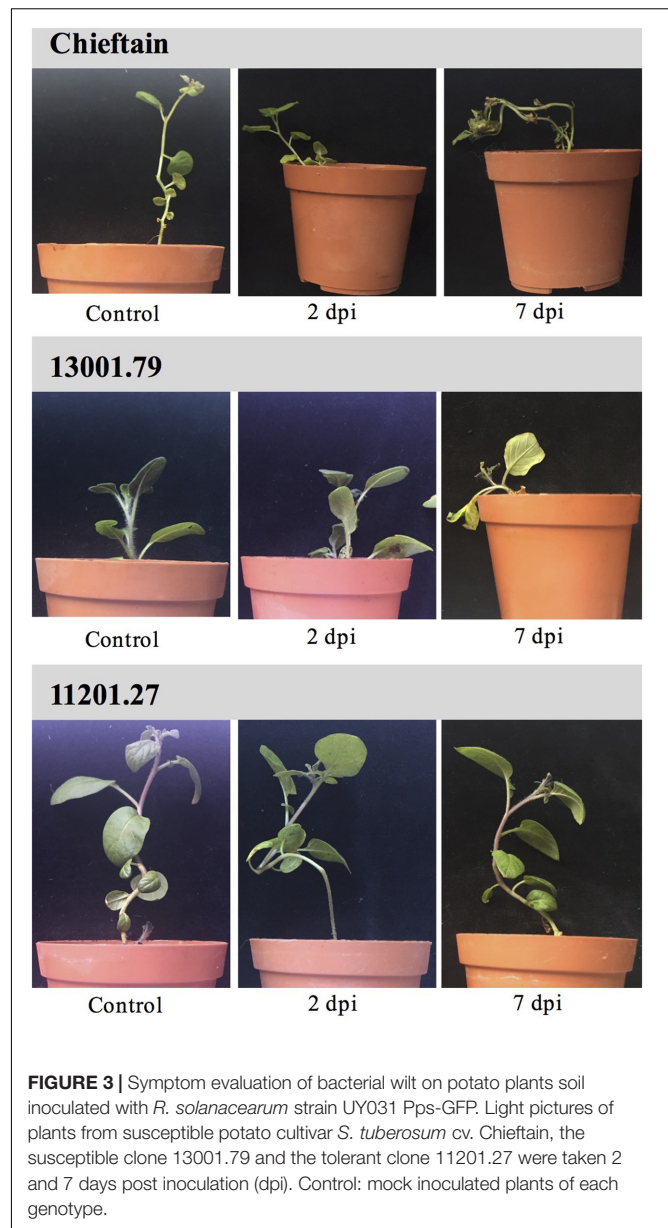


observed between healthy and infected plants (Figures 8A,C). The tolerant clone showed a stronger and more extended ROS production after pathogen infection compared to the mock inoculated plants (Figures 8B,D). In infected plants of this clone the brown precipitate revealing ROS production was mainly observed around the conductor tissue and throughout the apoplast (Figure 8D).

DISCUSSION

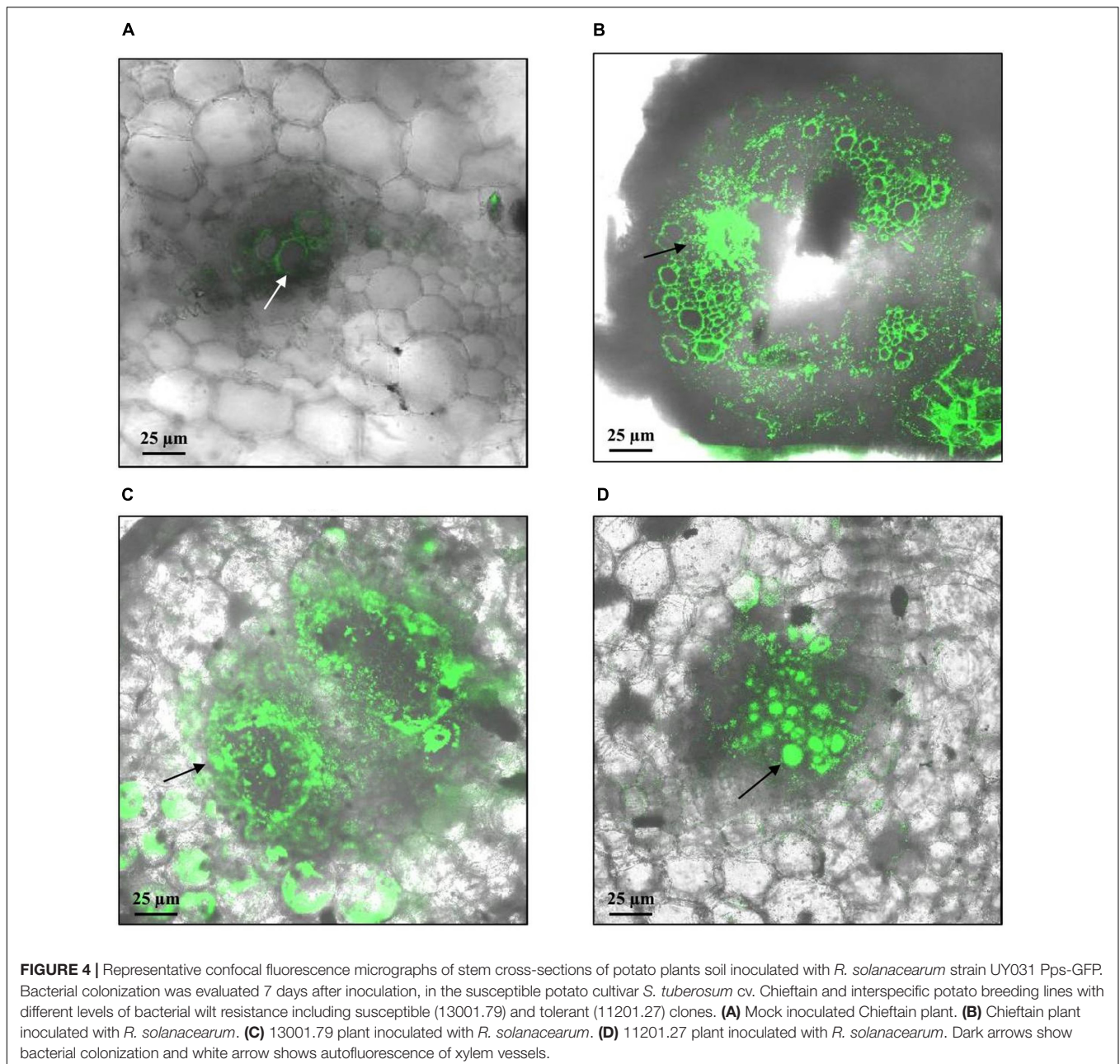
Breeding programs focused on the development of bacterial wilt resistant potato varieties are hampered by the scarcity of stable resistance sources against *R. solanacearum*. In this study we present the evaluation of selected interspecific clones from the potato breeding program developed in Uruguay, based on the introgression of resistance from *S. commersonii*. This wild species was previously reported to carry resistance against *R. solanacearum* (Laferriere et al., 1999; Carputo et al., 2009), however, these studies were limited to only one or few accessions, and the resistance sources were not further improved considering required agronomic and commercial traits. In contrast, our national potato breeding program makes use of the high genetic diversity available in this species which is widely distributed and adapted to our environmental conditions (Pianzola et al., 2005; Siri et al., 2009, 2011; Gaiero et al., 2017).

The challenge of advanced pre-breeding materials belonging to different backcross populations showed consistent results in



repeated experiments, attesting to the reliability of the wounded-roots soil inoculation procedure and the contrasting responses against *R. solanacearum* infection. Based on wilting scoring and detection of latent infections, the evaluated clones were classified as susceptible (similar disease progression than a susceptible potato cultivar) or tolerant (when most plants replicates remain asymptomatic 28 days post inoculation and the pathogen is present in stems). Interestingly, some breeding lines even after one or two backcrosses with susceptible *S. tuberosum* germplasm presented low level of bacterial wilt incidence and therefore maintained the resistance from the wild species.

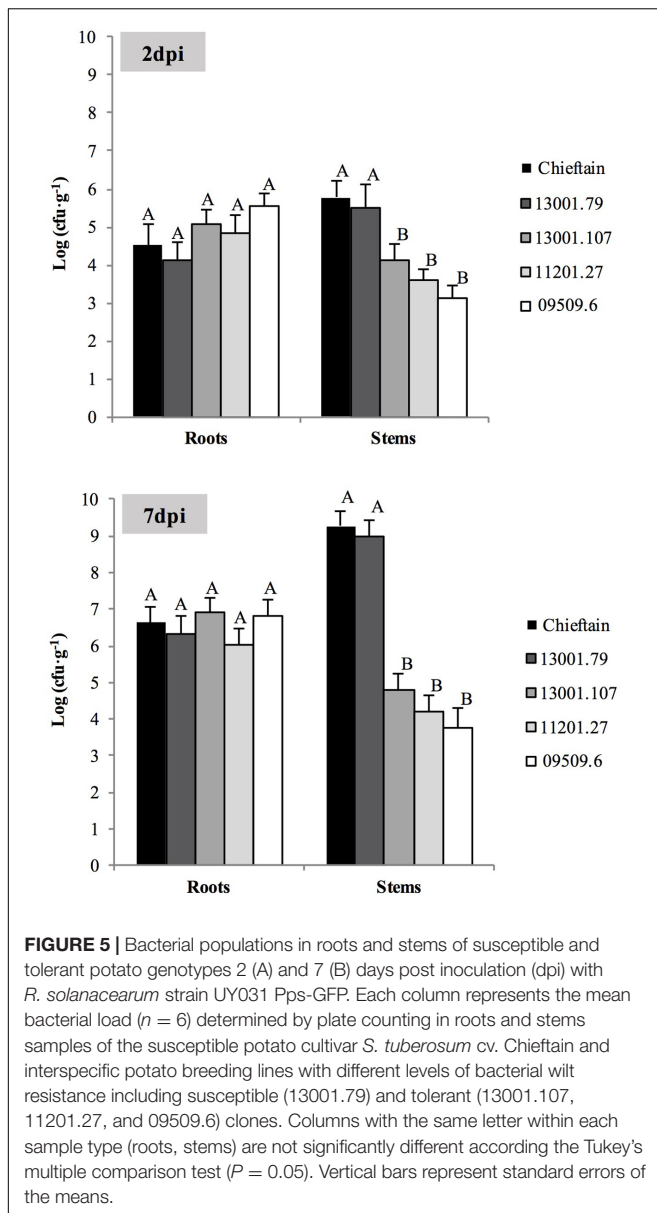
Asymptomatic latent infections caused by *R. solanacearum* should be considered in potato breeding programs to avoid the selection of tolerant varieties which would promote pathogen dissemination under favorable environmental conditions (Priou



et al., 2005). This problem is not exclusive for potato and was observed in previous studies for other hosts of *R. solanacearum* including pepper, tomato, eggplant, and geranium (Swanson et al., 2005; Lebeau et al., 2011; Heshan et al., 2017). By assessing phenotypes based on wilting symptoms and pathogen detection in plant tissues, it is possible to differentiate two mechanisms of defense: plant resistance based on limitation of pathogen access to the vascular system (immunity) and resistance based on plant survival harboring the bacteria within xylem vessels (latent infection or tolerance) (Lebeau et al., 2011). Resistance screening of potato germplasm derived from the wild species *S. commersonii* did not reveal immunity to *R. solanacearum*. However, it is important to consider that the assay used in

this study for resistance evaluation is more severe than usual field conditions, as the plantlets have thinner stems and limited rooting systems, the pathogen is present at high concentration in soil (10^6 cfu·g⁻¹), the roots are artificially damaged and the incubation conditions are optimal for disease development.

The occurrence of asymptomatic infections in susceptible potato cultivars may be a way of pathogen dissemination, particularly in temperate growing regions with slower disease progress. Introducing the evaluation of latency in our breeding program aimed to avoid a selection only based on wilting symptoms. In addition, pollen fertility, tuber quality and other agronomic traits are also being considered when selecting the best parental material for future crosses. Although no truly



resistant genotypes were found in this study, partial resistant or highly tolerant clones showing a low proportion of wilted plants and restricted pathogen colonization should be considered as a valuable genetic resource for breeding. The usefulness of these clones would be appreciated in severely infected tropical lands, where acceptable potato yields would only be achieved with them. This extent and the use of the harvested tubers as potato seeds should be further studied.

Methods allowing localization and visualization of microbes have account for a substantial progress in the understanding of the interactions between pathogen and its host plants. The ability of *R. solanacearum* reporter strain UY031 Pps-lux to emit bioluminescence *in planta* reported by Cruz et al. (2014), was here extended with the implementation of a fluorescent GFP-tagged *R. solanacearum* strain (UY031 Pps-GFP) as an

additional tool for pathogen localization within infected tissues. To achieve strong and stable expression of the reporter systems, *gfp* and *lux* genes were integrated in a neutral position of the *R. solanacearum* genome under the control of a constitutive plastid promoter (*psbA*) (Wang et al., 2007; Monteiro et al., 2012). GFP-labeled reporter strains have distinct advantages, including the ability to detect bacteria at the single-cell level when are used in combination with microscopic observations (Kohlmeier et al., 2007). On the other hand, luminescent reporters are more sensitive, allows for a non-destructive *in vivo* imaging, and quantification of the emitted luminescence could be correlated with bacterial loads in infected tissues (Cruz et al., 2014).

Both reporter strains were readily detected in potato plants with visible wilting symptoms. In susceptible clones the transition into a symptomatic stage relied on extensive pathogen multiplication both in lower and upper stem segments, reaching a high population density soon after inoculation. This situation was correlated with the observation of dense bacterial cells aggregates in stem parenchymatic tissues and filling a large proportion of xylem vessels causing a progressively lower water conduction ability. In our previous study using the UY031 Pps-lux reporter strain, tolerant *S. commersonii* plants remained asymptomatic after inoculation and showed high bacterial colonization in root systems but not in the stems (Cruz et al., 2014). In the present study, using the same reporter strain and inoculation procedures, luminescence was detected not only in the root systems but also in the stem base of asymptomatic plants. Since tolerant clones currently evaluated were obtained from backcross populations with the susceptible parent *S. tuberosum*, this extended pathogen distribution may be attributed to the differential genetic background compared to the *S. commersonii* accessions previously evaluated.

Results obtained in this study suggest that resistance in potato is clearly related with the host capability to restrict bacterial colonization and multiplication, particularly limiting dissemination along the stem. This is in agreement with previous observations in tomato resistant and tolerant genotypes (Grimault et al., 1994a; Nakaho et al., 2000, 2004). However, in these latently infected tomato plants, pathogen densities in stems were higher (10^5 – 10^8 cfu.g⁻¹) (Grimault et al., 1994a), compared to bacterial loads reached in tolerant potato plants (10^3 – 10^4 cfu.g⁻¹). It is probably that pathogen translocation from root to stem tissues and/or pathogen multiplication in stems are prevented in a more efficiently way in potato genotypes, leading to higher levels of resistance to bacterial wilt. Another difference between bacterial wilt resistance mechanisms in both crops refers to root colonization. It was recently reported that resistance in tomato is partly due to the ability of tolerant plants to restrict bacterial root colonization in space and time (Caldwell et al., 2017). However, results obtained in this study consistently showed no differences regarding the colonization and distribution pattern in root systems of susceptible and tolerant clones. This finding was obtained by luminescence quantification, confocal microscopy observations and plate counting, strongly suggesting that at least in these potato clones, limitation of pathogen infection occurs later on.

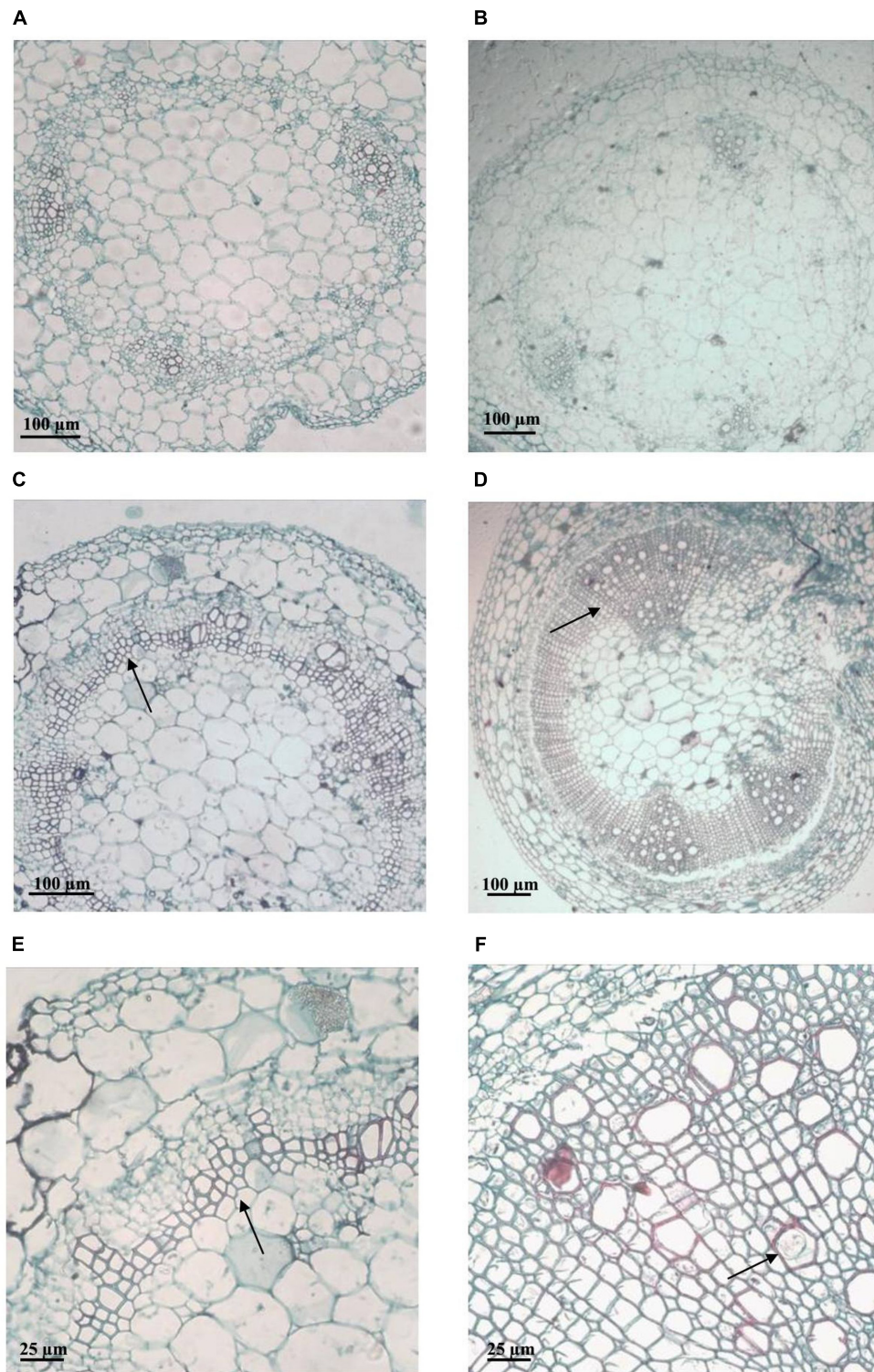


FIGURE 6 | Representative light micrographs of safranin-fast green stained stem cross-sections of plants from the susceptible potato cultivar *S. tuberosum* cv. Chieftain and the tolerant clone 09509.6. Xylem vessels architecture was evaluated 5 days after soil inoculation with *R. solanacearum* UY031 strain and compared to mock inoculated plants. Safranin dyes secondary cell walls red and fast green dyes cellulose light blue. **(A)** Mock inoculated Chieftain plant. **(B)** Mock inoculated 09509.6 plant. **(C,E)** Chieftain plant inoculated with *R. solanacearum*. **(D,F)** 09509.6 plant inoculated with *R. solanacearum*. Dark arrows show hyperplastic activity and lignin deposition **(C–E)**, or xylem vessels occluded by tyloses with globular shape **(F)**.

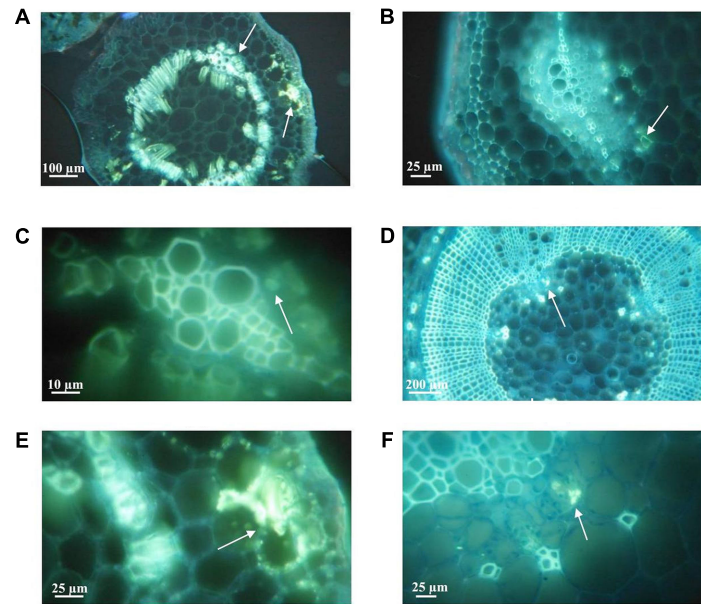


FIGURE 7 | Representative fluorescence (GFP) micrographs of aniline blue stained stem cross-sections of plants from the susceptible potato cultivar *S. tuberosum* cv. Chieftain and the tolerant clone 09509.6. Callose deposition was detected as yellow fluorescence zones (white arrows) 2 days after stem inoculation with *R. solanacearum* UY031 strain and compared to mock inoculated plants. **(A)** Chieftain plant inoculated with *R. solanacearum*. **(B)** Mock inoculated 09509.6 plant. **(C)** Xylem vessels of Chieftain plant inoculated with *R. solanacearum*. **(D)** 09509.6 plant inoculated with *R. solanacearum*. **(E)** Cortical parenchyma of Chieftain plant inoculated with *R. solanacearum*. **(F)** Internal phloem tissue of tolerant potato genotype 09509.6 inoculated with *R. solanacearum*.

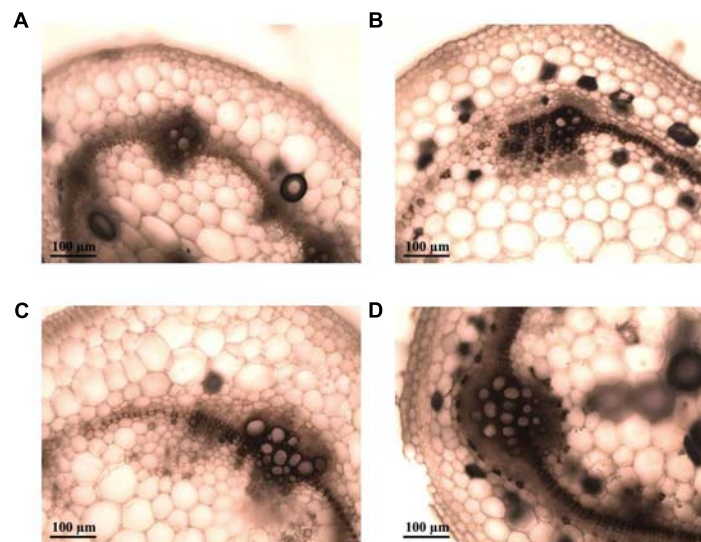


FIGURE 8 | Representative light micrographs of diamino benzidine (DAB) stained stem cross-sections of plants from the susceptible potato cultivar *S. tuberosum* cv. Chieftain and the tolerant clone 09509.6. Reactive oxygen species (ROS) production was evaluated 24 h after stem inoculation with *R. solanacearum* UY031 strain and compared to mock inoculated plants. DAB forms a brown precipitate in presence of hydrogen peroxide, indicating ROS production. **(A)** Mock inoculated Chieftain plant. **(B)** Mock inoculated 09509.6 plant. **(C)** Chieftain plant inoculated with *R. solanacearum*. **(D)** 09509.6 plant inoculated with *R. solanacearum*.

Plant resistance to pathogens is the consequence of interconnected constitutive and inducible defense responses. The possible infection paths and the molecular mechanisms underlying plant defenses have been recently reviewed for several

xylem-colonizing pathogens, including *R. solanacearum* (Yadeta and Thomma, 2013; Bae et al., 2015). Plant cell wall is one of the first structural barriers that pathogens have to cross to successfully infect plant tissues (Miedes et al., 2014). Pathogens

also need to breakdown cell walls as a source of nutrients for their growth once inside the host. Plants have evolved specialized mechanisms for detecting intruders and sensing the cell wall integrity. Pathogen recognition induces the cell wall remodeling to restrict pathogen colonization and spreading needed for disease control (Bellincampi et al., 2014). This process involves structural and chemical changes, including lignification, callose deposition, cell wall protein cross-linking, production of reactive oxygen species and antimicrobial compounds.

In tomato cultivars with resistance to bacterial wilt, physical barriers are involved in limitation of pathogen spread. In the resistant cultivar Carabo, many tyloses were found occluding pathogen-colonized and contiguous xylem vessels (Grimault et al., 1994b). On the other hand, tylose formation was not induced in infected tomato plants other resistant cultivar (L S-89) (Nakaho, 1997). In this cultivar, prevention of pathogen spread in plant tissues was related with the reinforcement of cell walls and the pit membranes, and also with the accumulation of electron-dense materials in vessels and around parenchyma cells (Nakaho et al., 2000).

Herein, the tolerant potato clone displayed significant structural responses after soil inoculation with *R. solanacearum*. Cell division with the generation of increased quantity of conductor tissue, lignin deposition and thickening of xylem vessels were clearly observed. In addition, in infected plants of this clone several vessels plugged by tyloses with globular shape were observed. This type of tyloses results from expansion of parenchyma cells associated to xylem vessels, probably preventing pathogen transportation within xylem vessels (Kpémoua et al., 1996).

Callose deposition and ROS production are additional first line responses in plant defense (Stone and Clarke, 1992; Lamb and Dixon, 1997). Callose is an amorphous polymer where antimicrobial compounds are deposited, leading to delivery of chemical defenses in specific points of attack (Luna et al., 2011). Although callose deposition contributes to plant immunity against many plant pathogens, it was reported that these structures were also found in sites of pathogen entry (Aist, 1976; Voigt, 2014). In this study, no differences were found between healthy and infected plants of the tolerant genotype, and callose was abundant even in mock inoculated plants. This finding suggests that constitutive callose deposition in these tolerant plants could contribute to reinforce the strength of plant cell walls preventing pathogen spreading.

Reactive oxygen species production is induced after several forms of biotic and abiotic stress. It has been suggested to prevent disease progress, either by directly causing pathogen death, or by promotion of a reinforcement of the cell wall through cross-linking of proteins and phenolics (Thordal-Christensen et al., 1997; Brown et al., 1998). In tomato, increased level of ROS production and lignin deposition in cell wall could promote bacterial wilt resistance in tomato (Mandal et al., 2011). Our results showed an induced ROS production after *R. solanacearum* infection in tolerant plants. However, quantitative evaluation of

ROS production over time including additional potato genotypes is needed to further determine the implications of this plant defense response.

This study proved that tolerant potato clones may show none or few symptoms while being partially to highly colonized by *R. solanacearum* in roots and stems. Our results suggest that the restricted pathogen multiplication in stems of tolerant genotypes is a consequence of constitutive or induced structural and biochemical plant defense responses. However, several aspects of this plant-pathogen interaction, and the consequences of latent infection in potato resistance should be further investigated. This study highlights the potential of the selected tolerant potato interspecific clones as valuable genetic resources for potato-breeding programs and leads to a better understanding of resistance against *R. solanacearum* in potato.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

VF, MP, FV, GG, MV, and MS conceived and designed the work. VF performed all the experiments, MT and MR contribute to histological evaluations. MP, FV, EO, MV, and MS provided reagents and materials. All authors contributed to analysis and interpretation of results. VF, MR, EO, GG, MV, and MS wrote the manuscript. All authors have made substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

FUNDING

This work was founded by grants FMV_2009_1_3045 and CSIC I+D-Grupos 652 and the Basics Sciences Development Program (PEDECIBA) from Uruguay. VF received a Ph.D. scholarship from the Academic Postgraduate Committee (CAP) from Universidad de la República (UdelaR) and a travel fellowship provided by the Association of Universities Group Montevideo (AUGM) to perform a stage in EO's lab in Rosario, Argentina.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Castillo and technical staff from the Biotechnology Laboratory in INIA Las Brujas (Uruguay) for logical support with *in vitro* plant propagation. We also are grateful to M. Capellades for technical assistance with potato breeding lines propagation in M. Valls' lab (CRAG, Barcelona). We thank M. Diaz and M. Di Doménico for technical assistance in confocal microscopy.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.01424/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Aist, J. R. (1976). Papillae and related wound plugs of plant cells. *Annu. Rev. Phytopathol.* 14, 145–163. doi: 10.1146/annurev.py.14.090176.001045
- Bae, C., Han, S. W., Song, Y. R., Kim, B. Y., Lee, H. J., Lee, J. M., et al. (2015). Infection processes of xylem-colonizing pathogenic bacteria: possible explanations for the scarcity of qualitative disease resistance genes against them in crops. *Theor. Appl. Genet.* 128, 1219–1229. doi: 10.1007/s00122-015-2521-1
- Bellincampi, D., Cervone, F., and Lionetti, V. (2014). Plant cell wall dynamics and wall-related susceptibility in plant–pathogen interactions. *Front. Plant Sci.* 5:228. doi: 10.3389/fpls.2014.00228
- Boshou, L. (2005). “A broad review and perspective on breeding for resistance to bacterial wilt,” in *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*, eds C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward (St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press), 225–238.
- Brown, I., Trethowan, J., Kerry, M., Mansfield, J. W., and Bolwell, G. P. (1998). Location of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. *Plant J.* 15, 333–343. doi: 10.1046/j.1365-313X.1998.00215.x
- Caldwell, D., Kim, B. S., and Iyer-Pascuzzi, A. S. (2017). *Ralstonia solanacearum* differentially colonizes roots of resistant and susceptible tomato plants. *Phytopathology* 107, 528–536. doi: 10.1094/PHYTO-09-16-0353-R
- Carpato, D., Aversano, R., Barone, A., Di Matteo, A., Iorizzo, M., Sigillo, L., et al. (2009). Resistance to *Ralstonia solanacearum* of sexual hybrids between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. *Am. J. Pot. Res.* 86, 196–202. doi: 10.1007/s12230-009-9072-4
- Cruz, A. P. Z., Ferreira, V., Pianzola, M. J., Siri, M. I., Coll, N., and Valls, M. (2014). A novel, sensitive method to evaluate potato germplasm for bacterial wilt resistance using a luminescent *Ralstonia solanacearum* reporter strain. *Mol. Plant Microbe Interact.* 27, 277–285. doi: 10.1094/MPMI-10-13-0303-FI
- Daurelio, L. D., Tondo, M. L., Dunger, G., Gottig, N., Ottado, J., and Orellano, E. (2009). “Hypersensitive response,” in *Plant Bioassays*, eds S. S. Narwal, A. N. Catala'n, D. A. Sampietro, M. A. Vattuone, and B. Polyticka (Houston, TX: Studium Press LLC), 87–206.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., and Robledo, C. W. (2009). *InfoStat 2009 Version*. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba.
- Elphinstone, J. G. (2005). “The current bacterial wilt situation: a global overview,” in *Bacterial Wilt: The Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*, eds C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward (St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press), 9–28.
- Elphinstone, J. G., Hennessy, J., Wilson, J. K., and Stead, D. E. (1996). Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *EPPO Bull.* 26, 663–678. doi: 10.1111/j.1365-2338.1996.tb01511.x
- FAOSTAT (2014). *Food and Agriculture Organisation Statistics Database*. Available at: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E> [accessed May 03, 2017].
- Fegan, M., and Prior, P. (2005). “How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex?,” in *Bacterial Wilt: The Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*, eds C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward (St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press), 449–461.
- Gaiero, P., Mazzella, C., Vilaró, F., Speranza, P., and de Jong, H. (2017). Pairing analysis and in situ Hybridisation reveal autopolyploid-like behaviour in *Solanum commersonii* × *S. tuberosum* (potato) interspecific hybrids. *Euphytica* 213, 137–151. doi: 10.1007/s10681-017-1922-4
- Genin, S., and Denny, T. P. (2012). Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex. *Annu. Rev. Phytopathol.* 50, 67–89. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-173000
- Grimault, V., Anais, G., and Prior, P. (1994a). Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. *Plant Pathol.* 43, 663–668. doi: 10.1111/j.1365-3059.1994.tb01604.x
- Grimault, V., Gélie, B., Lemattre, M., Prior, P., and Schmit, J. (1994b). Comparative histology of resistant and susceptible tomato cultivars infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44, 105–123. doi: 10.1016/S0885-5765(05)80105-5
- Grimault, V., and Prior, P. (1993). Bacterial wilt resistance in tomato associated with tolerance of vascular tissues to *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Pathol.* 42, 589–594. doi: 10.1111/j.1365-3059.1993.tb01539.x
- Guarischi-Sousa, R., Puigvert, M., Coll, N. S., Siri, M. I., Pianzola, M. J., Valls, M., et al. (2016). Complete genome sequence of the potato pathogen *Ralstonia solanacearum* UY031. *Stand. Genomic Sci.* 11, 7–14. doi: 10.1186/s40793-016-0131-4
- Heshan, D., Chen, B., Zhang, X., Zhang, F., Miller, S. A., Rajashekara, G., et al. (2017). Evaluation of *Ralstonia solanacearum* infection dynamics in resistant and susceptible pepper lines using bioluminescence imaging. *Plant Dis.* 101, 272–278. doi: 10.1094/PDIS-05-16-0714-RE
- Hooker, W. J. (1981). *Compendium of Potato Diseases*. St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press.
- Huet, G. (2014). Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. *Front. Plant Sci.* 5:715. doi: 10.3389/fpls.2014.00715
- Johansen, D. A. (1940). *Plant Microtechnique*. London: McGraw-Hill Book Company.
- Kelman, A. (1954). The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. *Phytopathology* 44, 693–695.
- Kohlmeier, S., Mancuso, M., Tecon, R., Harms, H., van der Meer, J. R., and Wells, M. (2007). Bioreporters: gfp versus lux revisited and single-cell response. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1578–1585. doi: 10.1016/j.bios.2006.07.005
- Kpémoua, K., Boher, B., Nicole, M., Calatayud, P., and Geiger, J. P. (1996). Cytochemistry of defense responses in cassava infected by *Xanthomonas campestris* pv. *manihofis*. *Can. J. Microbiol.* 42, 1131–1143. doi: 10.1139/m96-145
- Laferrère, L. T., Helgeson, J. P., and 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, 1272–1278. doi: 10.1007/s001220051193
- Lamb, C., and Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251–275. doi: 10.1146/annurev-arplant.48.1.251
- Lebeau, 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. doi: 10.1094/PHYTO-02-10-0048
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B., and Ton, J. (2011). Callose deposition: a multifaceted plant defense response. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24, 183–193. doi: 10.1094/MPMI-07-10-0149
- Machida-Hirano, R. (2015). Diversity of potato genetic resources. *Breed. Sci.* 65, 26–40. doi: 10.1270/jsbbs.65.26
- Mandal, S., Das, R. K., and Mishra, S. (2011). Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 117–123. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.10.006
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., et al. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 614–629. doi: 10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x
- Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W., and Molina, A. (2014). The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Front. Plant Sci.* 5:358. doi: 10.3389/fpls.2014.00358
- Monteiro, F., Sole, M., van Dijk, I., and Valls, M. (2012). A chromosomal insertion toolbox for promoter probing, mutant complementation, and pathogenicity studies in *Ralstonia solanacearum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 557–568. doi: 10.1094/MPMI-07-11-0201
- Nakaho, K. (1997). Distribution and multiplication of *Ralstonia solanacearum* (synonym *Pseudomonas solanacearum*) in tomato plants of resistant rootstock cultivar LS-89 and susceptible Ponderosa. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63, 83–88. doi: 10.3186/jjphytopath.63.83

- Nakaho, K., Hibino, H., and Miyagawa, H. (2000). Possible mechanisms limiting movement of *Ralstonia solanacearum* in resistant tomato tissues. *J. Phytopathol.* 148, 181–190. doi: 10.1046/j.1439-0434.2000.00476.x
- Nakaho, K., Inoue, H., Takayama, T., and Miyagawa, H. (2004). Distribution and multiplication of *Ralstonia solanacearum* in tomato plants with resistance derived from different origins. *J. Gen. Plant Pathol.* 70, 115–119. doi: 10.1007/s10327-003-0097-0
- Narancio, R., Zorrilla, P., Robello, C., Gonzalez, M., Vilaro, F., Pritsch, C., et al. (2013). Insights on gene expression response of a characterized resistance genotype of *Solanum commersonii* Dun. against *Ralstonia solanacearum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 136, 823–835. doi: 10.1007/s10658-013-0210-y
- Patil, V. U., Gopal, J., and Singh, B. P. (2012). Improvement for bacterial wilt resistance in potato by conventional and biotechnological approaches. *Agric. Res.* 1, 299–316. doi: 10.1007/s40003-012-0034-6
- Peeters, N., Guidot, A., Vailleau, F., and Valls, M. (2013). *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Mol. Plant Pathol.* 14, 651–662. doi: 10.1111/mpp.12038
- Pianzola, M. J., Zaranonelli, L., González, G., Franco Fraguas, L., and Vázquez, A. (2005). Genetic, phytochemical and biochemical analyses as tools for biodiversity evaluation of wild *Solanum commersonii* accessions. *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 67–78. doi: 10.1016/j.bse.2004.05.012
- Priou, S., Aley, P., and Gutarra, L. (2005). “Assessment of resistance to bacterial wilt in CIP advanced potato clones,” in *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*, eds C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward (St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press), 261–267.
- Safni, I., Cleenwerck, I., De Vos, P., Fegan, M., Sly, L., and Kappler, U. (2014). Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 3087–3103. doi: 10.1099/ijs.0.066712-0
- Siri, M. I., Galván, G. A., Quirici, L., Silvera, E., Villanueva, P., Ferreira, F., et al. (2009). Molecular marker diversity and bacterial wilt resistance in wild *Solanum commersonii* accessions from Uruguay. *Euphytica* 165, 371–382. doi: 10.1007/s10681-008-9800-8
- Siri, M. I., Sanabria, A., and Pianzola, M. J. (2011). Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Uruguay. *Plant Dis.* 95, 1292–1301. doi: 10.1094/pdis-09-10-0626
- Stone, B. A., and Clarke, A. E. (1992). *Chemistry and Biology of (1-3)-β-glucans*. Bundoora: La Trobe University Press.
- Strittmatter, C. (1979). Modificación de una técnica de coloración safranina-fast green. *Bol. Soc. Argen. Bot.* 18, 121–122.
- Swanson, J. K., Yao, J., Tans-Kersten, J., and Allen, C. (2005). Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. *Phytopathology* 95, 136–143. doi: 10.1094/PHYTO-95-0136
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., and Collinge, D. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *Plant J.* 11, 1187–1194. doi: 10.1046/j.1365-313X.1997.11061187.x
- Voigt, C. A. (2014). Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Front. Plant Sci.* 5:168. doi: 10.3389/fpls.2014.00168
- Wang, K., Kang, L., Anand, A., Lazarovits, G., and Mysore, K. S. (2007). Monitoring in planta bacterial infection at both cellular and whole-plant levels using the green fluorescent protein variant GFPuv. *New Phytol.* 174, 212–223. doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.01999.x
- Yadeta, K. A., and Thomma, B. P. (2013). The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Front. Plant Sci.* 4:97. doi: 10.3389/fpls.2013.00097
- 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* 16:246. doi: 10.1186/s12864-015-1460-1

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Ferreira, Pianzola, Vilaró, Galván, Tondo, Rodríguez, Orellano, Valls and Siri. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.