



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Ciencias con Mención Microbiología

**PROPUESTA METODOLÓGICA PARA LA
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR ESPECÍFICA DE
RALSTONIA SOLANACEARUM BASADA EN EL
MARCADOR MOLECULAR ADN RIBOSOMAL 16S**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención
Microbiología

**VALENTINA VERÓNICA TRONCOSO SEPÚLVEDA
CONCEPCIÓN-CHILE
2022**

Profesor Guía: Homero Urrutia Briones
Dpto. de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

Dr. Homero Urrutia Briones
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Profesor Co-Guía

Dr. Felipe Aguilera Muñoz Facultad
de Ciencias Biológicas Universidad
de Concepción

Comisión Evaluadora

Dra. Ivette Acuña
Instituto de Investigaciones
Agropecuarias CRI Remehue

Dr. Mauricio Schoebitz Cid
Laboratorio Microbiología de Suelos
Facultad de Agronomía UdeC

Dr. Gerardo González Rocha
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Director(S) de Programa

Dr. Andrés Opazo Capurro
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

AGRADECIMIENTOS

Agradecer a los proyectos que hicieron posible el desarrollo de este trabajo y lo financiaron, adjudicados por el Dr. Homero Urrutia y Dra(c). Natalia Padilla. Estos proyectos corresponden a FONDEF ID19il10382 y Fondef VIU 18ED125, respectivamente.

Agradecer al Dr. Felipe Aguilera (co-tutor) quien facilitó y dirigió el procesamiento de datos utilizando herramientas bioinformáticas. Su estación de trabajo computacional posee un procesador Xeon E3-1240v6 QuadCore 3.7-4.1GHz, 32GB RAM, y dos discos duros (500GB SSD y 2TB HDD), y acceso ilimitado a un servidor que consiste de 24 procesadores, 128GB RAM, y dos discos duros de 4TB HDD.

Agradecer a la Dra. Ximena Steinberg Investigadora Posdoctoral en el Laboratorio de Biopelículas, Centro de Biotecnología – UdeC, quien en base a su experiencia y conocimientos en Biología Molecular y Bioinformática orientó con profundo interés y dedicación el proceso desarrollo de metodologías, y análisis e interpretación de los resultados.

ÍNDICE

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS	X
ANEXOS	XI
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. Marchitez Bacteriana.....	4
1.3. Ciclo biológico de <i>Ralstonia solanacearum</i>	9
1.4. Diagnóstico de <i>Ralstonia solanacearum</i>	16
1.5. Gen ADNr 16S	18
1.6. Bases de datos del gen ADNr 16S	20
1.7. Secuenciación del gen ADNr 16S y su uso en la determinación filogenética y taxonómica de bacterias	21
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	26
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo general	27
4.2. Objetivos específicos	27
5. MATERIALES.....	28
5.1. Medios de cultivo.....	28
5.2. Soluciones.....	29
6. METODOLOGÍA.....	30
6.1. Muestreo de tejidos vegetales	30

6.2.	Condiciones de crecimiento para el aislamiento de <i>Ralstonia solanacearum</i>	31
6.3.	Caracterización fenotípica y bioquímica (parcial) de los aislamientos de <i>Ralstonia solanacearum</i>	32
6.4.	Identificación molecular de aislamientos basados en secuenciación del gen ADNr 16S	33
6.5.	Análisis de secuencias del gen ADNr 16S	34
6.6.	Análisis in-silico de las copias de secuencias completas del gen ADNr 16S en genomas bacterianos de interés	35
6.7.	Estudio genómico comparativo y análisis filogenético	36
6.8.	Diseño de partidores de la región hipervariable del gen ADNr 16S para identificar de manera especie-específica a <i>Ralstonia solanacearum</i>	37
6.9.	Análisis de las regiones hipervariables del gen ADNr 16S para el estudio de la comunidad bacteriana de <i>Ralstonia solanacearum</i>	39
7.	RESULTADOS	42
7.1.	Características fenotípicas y bioquímicas de los aislamientos bacterianos	42
7.2.	Análisis molecular de los aislamientos bacterianos	44
7.3.	Genómica comparativa de secuencias completas del gen ADNr 16S y determinación filogenética de los aislamientos bacterianos	47
7.4.	Diseño de partidores basado en las regiones variables en <i>R. solanacearum</i>	55
7.5.	Análisis de la región variable para análisis de <i>R. solanacearum</i> en muestras complejas de comunidades bacterianas	59
8.	DISCUSIÓN	64
9.	CONCLUSIONES	76
10.	REFERENCIAS	78
11.	ANEXOS	102

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Distribución geográfica del complejo de especies de *Ralstonia solanacearum*. Figura obtenida desde la organización europea de protección vegetal del Mediterráneo - Base de datos global de la EPPO (<https://gd.eppo.int/taxon/RALSSO/distribution>). 6

Figura 2. Principales revisiones taxonómicas para el complejo de especies de *Ralstonia solanacearum* (RSSC). La mitad inferior de la figura muestra la línea de tiempo cuando se introdujeron cambios en la taxonomía del complejo RSSC, y la mitad superior ilustra la taxonomía predominante utilizada para cada época. Para cada revisión taxonómica, en los recuadros rosados se indican los cambios en la clasificación, y los recuadros azules muestran niveles que no cambiaron. Los cuadros amarillos es la taxonomía revisada por Sharma y cols 2021 (Safni et al., 2014) (Imagen adaptada de Sharma y cols. 2021 y Creada en BioRender.com). 7

Figura 3. Triángulo de la enfermedad. El resultado de una interacción planta-patógeno está determinado por tres factores principales: patógeno, la planta huésped y el medio ambiente. Cuanto más permisivo sea el entorno, más durará el periodo de la infección. Cuanto mayor sea la virulencia frente un hospedero susceptible, mayor será la prevalencia del patógeno. (McNEW, 1960) (Figura adaptada de Scholthof 2007 basada en el triangulo original de McNew's y creada en BioRender.com). 10

Figura 4. Ciclo de la enfermedad producida por *Ralstonia solanacearum*. *R. solanacearum* puede sobrevivir en suelo, agua y malezas durante largos períodos de tiempo. Una vez que encuentra en las raíces de una planta huésped, *R. solanacearum* ingresa a través de heridas o raíces secundarias, colonizando hasta que entra al sistema vascular de la planta, donde aumenta la densidad produciendo el exopolisacárido que provoca la obstrucción de los vasos del xilema y la obstrucción de la circulación de agua, provocando así los síntomas de marchitamiento y posterior muerte de la planta. Una vez que la planta muere, la bacteria regresa al ambiente como potencial agente infeccioso para otros hospederos (Imagen creada en www.biorender.com). 12

Figura 5. Esquema del complejo ribosómico y el gen ADNr 16S. Los cuadros blancos y grises indican regiones conservadas y regiones hipervariables, respectivamente. Las flechas en negrita se muestran las posiciones aproximadas de los partidores universales en la secuencia del gen de ADNr 16S de la especie modelo *Escherichia coli* (Imagen adaptada de (Yarza et al., 2014) y generada en www.Biorender.com). 19

Figura 6. Resultados de la caracterización fenotípica y bioquímica de los aislamientos bacterianos desde tubérculos de papa. Para la caracterización fenotípica (1) se seleccionaron tubérculos con sintomatología de infección bacteriana. (1.1) Se observa la sección transversal de un tubérculo infectado con *R. solanacearum* que muestra una decoloración parcial de color marrón grisáceo de tejidos vasculares, y un típico exudado cremoso blanco o supuración a lo largo del anillo vascular. (1.2) Para la morfología de colonia típica de *R. solanacearum* en agar de cloruro de tetrazolio (TZC y SMSA-e) tras incubación 72 h a 28°C: colonias de forma irregular, fluidas y enteramente blancas o con un centro rosa (Kelman, 1954) y en agar CPG que muestra pequeñas colonias redondas de color crema. La selección final fue en base a los resultados de la tinción Gram. Para la caracterización bioquímica (2) se observó el cambio de coloración de verde a amarillo para considerar una reacción positiva..... 43

Figura 7. Análisis molecular del gen ADNr 16S de los aislamientos bacterianos. (A) Reconstrucción de una secuencia robusta y más extensa mediante el análisis de los cromatogramas y alineamiento múltiple de las amplificaciones realizadas con dos pares de partidores universales. (B) Alineamiento de secuencias con la base de datos de nucleótidos no redundantes en NCBI con la función megablast en línea y blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)..... 45

Figura 8. Árbol filogenético basado en el método de reconstrucción filogenética del Vecino Más Cercano que muestra la posición de las muestras bacterianas C y RS comparadas con secuencias parciales de cepas de Enterobacterias, Ralstonia, y Pseudomonas..... 46

Figura 9. Variabilidad nucleotídica a nivel intra-especies del complejo RSSC. 49

Figura 10. Árbol filogenético basado en el método de reconstrucción filogenética Maxima Verosimilitud de las copias del gen ADNr 16S de las especies: Enterobacteria, Pseudomona, *R. solanacearum*, junto con los productos de PCR reconstruidos de los aislamientos realizados en esta tesis. Los valores de bootstrap obtenidos con 1000 repeticiones se indican como porcentajes en todas las ramas. La barra de escala representa una distancia evolutiva de 0,03. Los números de acceso de GenBank de las diferentes especies se proporcionan en la Tabla 1. 51

Figura 11. Identificación de regiones variables entre *R. solanacearum*, Enterobacterias y Pseudomona (copias únicas). Las posiciones en color rojo son las que le permiten a *R. solanacearum* ser consideradas como hipervariables respecto al resto de las bacterias consideradas en este estudio. 54

Figura 12. Secuencia del gen ADNr 16S de *R. solanacearum* cepa UY031. Subrayado están marcadas las regiones variables. La base de inicio y fin de cada región variable esta en color rojo. En celeste se marcan las bases nitrogenadas de interés dentro de las regiones variables que mostraron diferencia con el resto de las especies analizadas en este estudio. En rosado se muestra la ubicación de los partidores diseñados. 56

Figura 13. Gel de agarosa al 1.2% mostrando los productos de PCR obtenidos utilizando 3 combinaciones con 3 partidores que amplifican la región variable en *R. solanacearum*. 58

Figura 14. Análisis de las diferentes bases de datos del gen ADNr 16S (SILVA). A. Diagrama de Venn de anotaciones de los taxones en las tres bases de datos SILVA. B. Cambios evolutivos del gen ADNr 16S para algunas especies de las familias Burkholderia y Enterobacterias según base de datos Silva 128V, C. Cambios evolutivos del gen ADNr 16S para algunas especies de las familias Burkholderia y Enterobacterias según base de datos Silva 132V y D. Cambios evolutivos del gen ADNr 16S para algunas especies de las familias Burkholderia y Enterobacterias según base de datos Silva 138V. 60

Figura 15. Gráfico de barra mostrando la abundancia relativa de los ASVs de las principales familias (A) y géneros (B) que se encontraron en los análisis metagenómicos

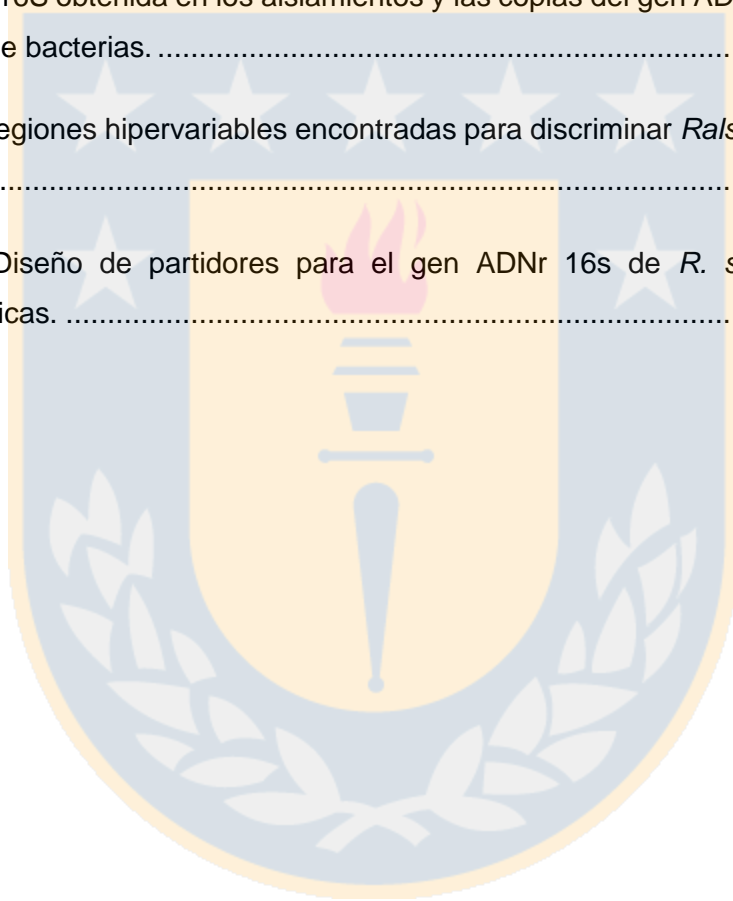
de las muestras ambientales de este estudio. Sample A y Sample B corresponden a muestras de suelo y Sample C a una muestra de agua..... 62

Figura 16. Regiones variables V3-V4 del gen ADNr 16S que presentan diferencias en sus bases nitrogenadas entre *R. solanacearum* y otra especies utilizadas en este estudio..... 63



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información taxonómica y origen de las especies/cepas utilizadas en los análisis de identidad bacteriana.....	48
Tabla 2. Porcentaje de similitud basada en la comparación de secuencias parciales del gen ADNr 16S obtenida en los aislamientos y las copias del gen ADNr 16S en diferentes especies de bacterias.	52
Tabla 3. Regiones hipervariables encontradas para discriminar <i>Ralstonia solanacearum</i>	55
Tabla 4. Diseño de partidores para el gen ADNr 16s de <i>R. solanacearum</i> y sus características.	57



ANEXOS

Anexo 1. Secuencias genómicas de los aislamientos bacterianos: Fusión de productos de PCR 27f-1492r y 341f-907r en una secuencia del gen ADNr 16S de longitud completa.

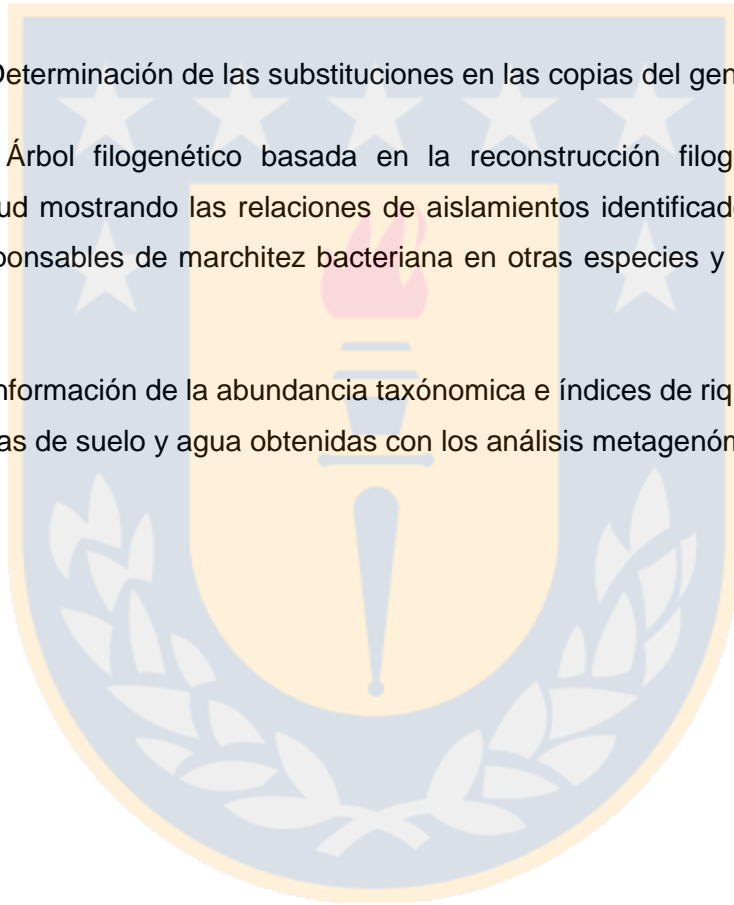
102

Anexo 2. Determinación de las substituciones en las copias del gen ADNr 16S..... 105

Anexo 3. Árbol filogenético basada en la reconstrucción filogenética de Máxima Verosimilitud mostrando las relaciones de aislamientos identificados en co-cultivo con cepas responsables de marchitez bacteriana en otras especies y patógenos de papa.

106

Anexo 4. Información de la abundancia taxónomica e índices de riqueza y diversidad de las muestras de suelo y agua obtenidas con los análisis metagenómicos. 107



RESUMEN

Ralstonia solanacearum es el principal patógeno causante de la enfermedad marchitez bacteriana, la que se encuentra distribuida en más de 80 países, reportando pérdidas de hasta el 100% de producción de más de 250 especies vegetales. *R. solanacearum* se ha descrito como patógeno cuarentenario, considerado una amenaza para la agricultura mundial debido a la capacidad que tiene de producir infecciones latentes asintomáticas que favorecen su diseminación global, dificultando el control de la enfermedad. La supervivencia saprofita y la propagación eficiente de este patógeno han sido las principales causas para elaborar exitosas medidas de control para su erradicación. Es por esto que el desarrollo de herramientas de detección específicas y sensibles son necesarias para su identificación y caracterización. Actualmente, existen diferentes metodologías fenotípicas, bioquímicas y moleculares para la caracterización de *R. solanacearum*. Sin embargo, estas metodologías presentan grandes dificultades para su implementación ya que no son exclusivas para *R. solanacearum*. En el presente trabajo, se abordó la problemática de discriminar en forma selectiva cepas de *R. solanacearum*. Para esto, se utilizaron herramientas bioinformáticas basadas en la secuenciación del gen 16S ADN ribosomal, las que permitieron confirmar que la estrategia de aislamiento convencional no permite aislar en forma selectiva únicamente cepas de *R. solacearum*, sino que también otras especies que se encuentran en co-cultivo junto a este patógeno. Nuestros resultados demostraron que la metodología diseñada en esta tesis permite identificar cepas axénicas de *R. solanacearum* y bacterias saprofitas pertenecientes a los órdenes *Enterobacterales* y *Pseudomonadales*. En su conjunto, estos resultados

permitieron identificar una región genómica conservada única en *R. solanacearum* para diseñar partidores específicos para la especie, los cuales pueden ser útiles para la identificación molecular de este patógeno de gran importancia agrícola y comercial.



ABSTRACT

Ralstonia solanacearum is the main pathogen causing bacterial wilt disease, which is distributed in more than 80 countries, reporting losses of up to 100% of production of more than 250 plant species. *R. solanacearum* has been described as a quarantine pathogen, considered a threat to world agriculture due to its ability to produce asymptomatic latent infections that favor its global spread, making disease control difficult. Saprophytic survival and efficient propagation of this pathogen have been the main causes for developing successful control measures for its eradication. This is because the development of specific and sensitive detection tools is necessary for their identification and characterization. Actually, there are different phenotypic, biochemical and molecular methodologies for the characterization of *R. solanacearum*. However, these methodologies present great difficulties for their implementation, because they are not exclusive to *R. solanacearum*. The revision requires the proper identification of *R. solanacearum* strains for diagnostic and epidemiological studies. To resolve this problem, we used bioinformatic tools based on the sequencing of the 16S ribosomal DNA gene, which confirmed that the conventional isolation strategy could not only isolate strains of *R. solacearum*, but also other species found in co-cultivation together with this pathogen. Our results showed that the methodology designed in this thesis allows to identify axenic strains of *R. solanacearum* and saprophytic bacterias belonging to the orders *Enterobacterales* and *Pseudomonadales*. Our results allowed us to identify a unique conserved genomic region in *R. solanacearum* to design species-specific primers, that could be useful for the molecular identification.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Marchitez Bacteriana

La marchitez bacteriana es considerada una de las enfermedades más destructiva del mundo que afecta cultivos alimentarios de alto valor nutricional y comercial, tales como papas, tomates, tabaco, jengibre y plátanos (Jiang et al., 2017; Yuliar et al., 2015), así como también, plantas ornamentales (Elphinstone, 1996a) y especies forestales (*Eucalyptus spp.*) (Álvarez Romero et al., 2021; Carstensen et al., 2017; Santiago et al., 2015). Recientemente, se han documentado nuevas especies con síntomas de marchitez bacteriana, tales como arándanos en Florida, EE.UU (Bocsanczy et al., 2019), rosas ornamentales en los Países Bajos (Bergsma-Vlami et al., 2018), y calabazas y moras en China (She et al., 2017a; Wang et al., 2008).

La enfermedad, según su sintomatología en papa, plátano, tabaco y geranio, asume distintos nombres descriptivos como podredumbre parda, enfermedad del Moko, enfermedad de Graville y marchitez del sur, respectivamente (García et al., 2019; Peeters et al., 2013a). Generalmente, estos síntomas se caracterizan por un retraso del crecimiento de las plantas, marchitamiento en hojas y tallos, además de un evidente exudado bacteriano en tallos y tubérculos (Bajracharya & Sapkota, 2017; Blomme et al., 2017).

De estos cultivos, la papa (*Solanum tuberosum* L.) es considerado el principal cultivo de hortalizas en términos de áreas de producción a nivel mundial y el tercer cultivo alimentario más importante del mundo (Bajracharya & Sapkota, 2017; Haverkort & Struik, 2015a). Además de ser susceptible al patógeno de la podredumbre parda, este cultivo es infectado por otras especies bacterianas, tales como *Pectobacterium* y *Dickeya* (Van Gijsegem et al., 2021).

La podredumbre parda en papa produce cada año pérdidas económicas de mil millones de dólares en todo el mundo (Mansfield et al., 2012), debido a que las pérdidas pueden llegar a alcanzar el 100% abarcando aproximadamente 1.7 millones de hectáreas en regiones tropicales, subtropicales y cálidas templadas en unos 80 países (Elazouni et al., 2019; Haverkort & Struik, 2015b).

La enfermedad de la marchitez bacteriana es asignada principalmente al complejo de especies *Ralstonia solanacearum* (RSSC) que comprende tres diferentes especies: *R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* y *R. syzigii* (Fegan & Prior, 2005); y en menor medida, a otros grupos de especies, incluyendo *Erwinia* (*Pectobacteria*), *Xanthomonas* (Blomme et al., 2017; Sanogo et al., 2011), *Pantoea* (Sarkar & Chaudhuri, 2015), *Clavibacter* (Boyaci et al., 2021), *Curtobacterium* y algunas especies de *Enterobacter* (Sarkar & Chaudhuri, 2015; Zhu et al., 2010a).

Ralstonia solanacearum

Ralstonia solanacearum afecta a más de 250 especies de plantas pertenecientes a 50 familias botánicas (Elphinstone, 1996a; Peeters et al., 2013b), y se caracteriza por tener una amplia distribución geográfica a nivel mundial (Hayward, 1991a) (Figura 1). Esta distribución ha permitido confirmar la extensa diversidad genética y fenotípica que existe dentro de la especie, a la cual se le ha denominado complejo de especies de *Ralstonia solanacearum* (RSSC) (Sharma et al., 2021).

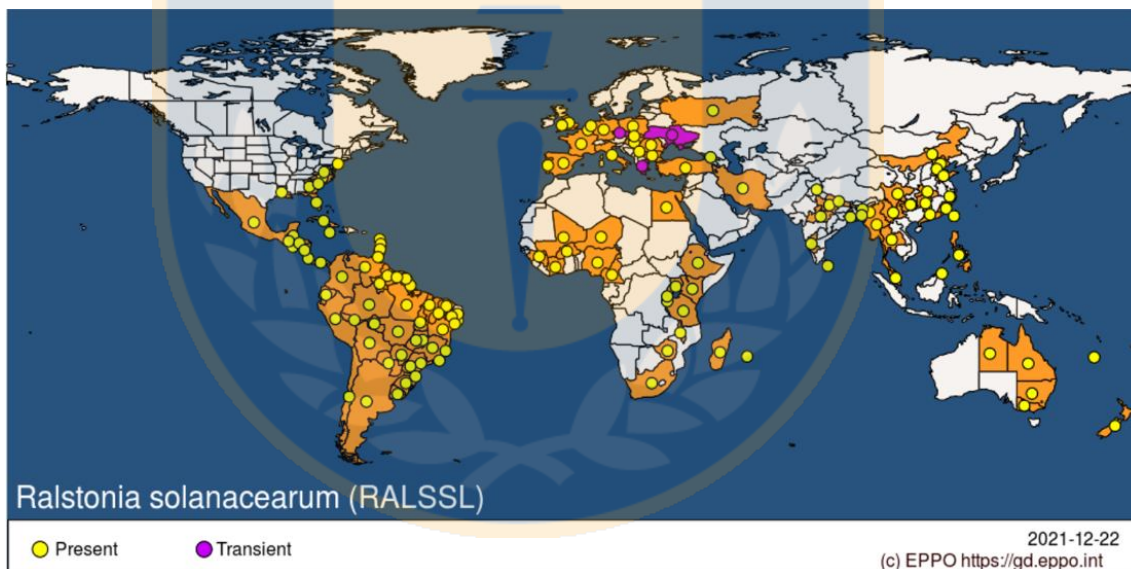


Figura 1. Distribución geográfica del complejo de especies de *Ralstonia solanacearum*. Figura obtenida desde la organización europea de protección vegetal del Mediterráneo - Base de datos global de la EPPO (<https://gd.eppo.int/taxon/RALSSO/distribution>).

Taxonómicamente, *Ralstonia solanacearum* (sinónimos: *Bacillus solanacearum*, *Bacterium solanacearum*, *Phytomonas solanacearum*, *Xanthomonas solanacearum*, *Pseudomonas solanacearum*, *Burkholderia solanacearum*) es una especie Gram negativa que pertenece al género *Ralstonia*, familia *Burkholderiaceae*, orden *Burkholderiales*, clase Gamaproteobacteria (Palleroni, 2015; Paudel et al., 2020). Esta es la última revisión taxonómica para el RSSC y se basa en las distancias evolutivas inferidas de las secuencias del genoma que se han utilizado para establecer la base de datos de taxonomía del genoma (GTDB, por sus siglas en inglés). Esta base de datos resolvió remover el filo Beta-proteobacteria a un subgrupo anidado dentro de la clase de Gamma-proteobacteria (Guo et al., 2013) (Figura 2).

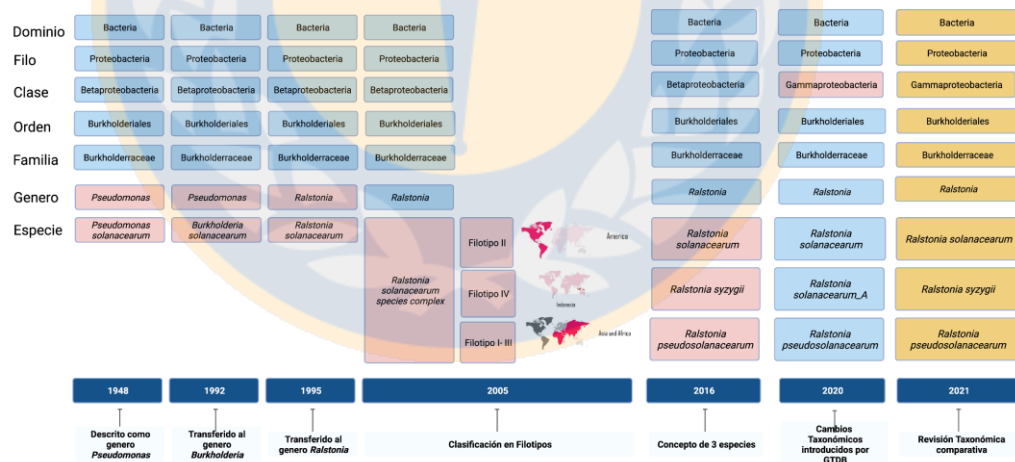


Figura 2. Principales revisiones taxonómicas para el complejo de especies de *Ralstonia solanacearum* (RSSC). La mitad inferior de la figura muestra la línea de tiempo cuando se introdujeron cambios en la taxonomía del complejo RSSC, y la mitad superior ilustra la taxonomía predominante utilizada para cada época. Para cada revisión taxonómica, en los recuadros rosados se indican los cambios en la clasificación, y los recuadros azules muestran niveles que no cambiaron. Los cuadros amarillos es la taxonomía revisada por Sharma y cols 2021 (Safni et al., 2014) (Imagen adaptada de Sharma y cols. 2021 y Creada en BioRender.com).

La extensa diversidad genética y fenotípica que existe dentro del complejo RSSC ha llevado a la subdivisión de este grupo en subgrupos, sobre todo para el control de la enfermedad y bioseguridad de las plantas (Sharma et al., 2021). La clasificación inicial del complejo RSSC fue basada según su fenotipo y características bioquímicas, agrupando las especies en cinco razas de acuerdo al rango de hospedadores y en cinco biovares según los azúcares y los carbohidratos que pueden metabolizar (Paudel et al., 2020). Posteriormente, gracias al uso de herramientas de biología molecular, la clasificación de *R. solanacearum* fue catalogada en filotipos, los que son genéticamente distintos y se correlacionan con los orígenes geográficos de las cepas. Estos filotipos son: filotipo I (Asia), II (América), III (África) y IV (Indonesia) (Fegan & Prior, 2005; Poussier et al., 2002). Esta nueva clasificación basada en filotipos condujo a la descripción de tres especies dentro del complejo RSSC: (i) *R. solanacearum* que incluye todas las cepas del filotipo II, (ii) *R. pseudosolanacearum* con todo el filotipo I y cepas de filotipo III, y (iii) *R. syzygi* con todas las cepas de filotipo IV (Safni et al., 2014). A su vez, estas especies se sub-clasifican en sequevares, los cuales son una taxonomía adicional basada en las relaciones filogenéticas que son determinadas según las variaciones en la secuencia en el gen parcial de la endoglucanasa (*egl*) (Fegan & Prior, 2005). En este contexto, Izadiyan y Taghavi (2019) reportaron un total de 57 sequevares dentro de los cuatro filotipos antes mencionados.

A nivel mundial, *R. solanacearum* se encuentra en segundo lugar en una lista que comprende a los diez principales patógenos de plantas (Mansfield et al., 2012a). Por lo tanto, *R. solanacearum* es considerado un patógeno cuarentenario (Unión Europea) (Janse, 2012) y se encuentra bajo la Ley de Protección contra el Bioterrorismo Agrícola

(Champoiseau, 2009). En Chile, la epidemiología de *R. solanacearum* es monitoreada por el Servicio Agrícola Ganadero (SAG). El último reporte corresponde a abril 2021, donde se declararon predios bajo cuarentena en el área libre en la región de la Araucanía y Los Ríos (SAG, 2021). El principal hospedero de *R. solanacearum* en Chile es la papa (CIAMPI-PANNO, 1984), aunque también se ha reportado en tomate (Vasconez et al., 2020). En ambos casos, se ha identificado como cepa responsable el Filotipo IIB sequevar 1 o Raza 3 biovar 2. La Raza 3 de *R. solanacearum* se distribuye en todo el mundo, y crece en zonas cálidas tropicales, con un crecimiento óptimo entre temperaturas 25°C a 30°C (Hayward, 1991). No obstante, la Raza 3 también tiene la capacidad de producir la enfermedad de marchitez bacteriana en climas fríos a diferencia de otras cepas y razas de *R. solanacearum* (Swanson et al., 2005).

1.2. Ciclo biológico de *Ralstonia solanacearum*

R. solanacearum tiene un ciclo de vida bifásico u oscilativo que contempla estados de virulencia y saprofitismo entre el huésped y en el ambiente, respectivamente. *R. solanacearum*, en asociación con plantas, produce una interacción estrecha que puede conducir a la marchitez bacteriana (y la muerte) de plantas susceptibles. Cuando *R. solanacearum* se encuentra en el ambiente en sistemas abiertos, tales como suelo, sedimentos y agua, la bacteria se encuentra generalmente a densidades celulares relativamente bajas y con cambios fenotípicos que le otorgan la capacidad de sobrevivencia en el ambiente (Denny, 2006a).

Para que *R. solanacearum* pueda tener éxito en la infección y provocar la enfermedad en su hospedero, debe ocurrir lo siguiente: existir un patógeno virulento, una planta huésped susceptible y un ambiente permisivo. Con todo lo anterior, se desarrolla el triángulo de la enfermedad (Scholthof, 2007) (Figura 3).

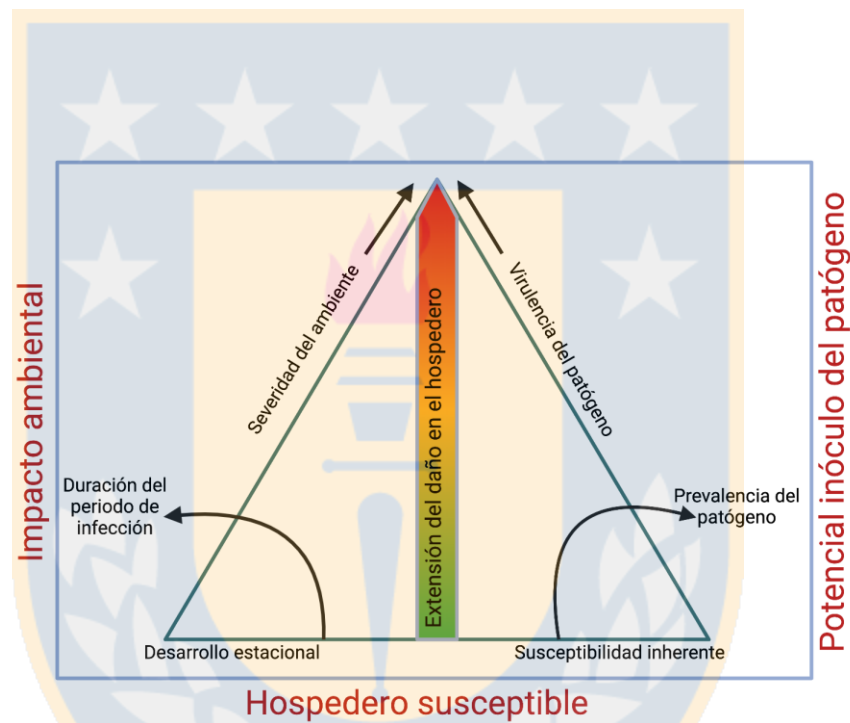


Figura 3. Triángulo de la enfermedad. El resultado de una interacción planta-patógeno está determinado por tres factores principales: patógeno, la planta huésped y el medio ambiente. Cuanto más permisivo sea el entorno, más durará el periodo de la infección. Cuanto mayor sea la virulencia frente un hospedero susceptible, mayor será la prevalencia del patógeno. (McNEW, 1960) (Figura adaptada de Scholthof 2007 basada en el triángulo original de McNew's y creada en BioRender.com).

R. solanacearum en el ambiente es capaz de sobrevivir en el agua, en residuos y en el suelo hasta que reconoce, mediante mecanismos de motilidad, quimiotaxis y aerotaxis, específicamente la rizosfera de las plantas hospedantes (Yao & Allen, 2006).

Luego, coloniza la raíz a través de la zona de elongación, heridas de la raíz o los puntos emergentes de la raíz secundaria para ingresar a través de los espacios apoplásticos corticales, que dan comienzo a la etapa de infección que permiten colonizar el cilindro vascular y los vasos del xilema (Digonnet et al., 2012). Este mecanismo es dependiente de la regulación enzimática, que permite hidrolizar los componentes de la pared celular (Genin & Denny, 2012; HIKICHI, 2016; Schell, 2000). Pocos días después de llegar a los vasos del xilema, *R. solanacearum* se multiplica rápidamente hasta aproximadamente 10^9 UFC g^{-1} de tejido (Jacobs et al., 2012). Esta densidad bacteriana es regulada por el sistema Quorum Sensing (QS) (Milling et al., 2011), el cual determina el fenotipo de la comunidad bacteriana, mediante moléculas señal auto-inductoras que permite activar la producción de exopolisacárido (EPS) identificado como el responsable de obstruir el sistema vascular de la planta para el flujo de agua, provocando el marchitamiento y posterior la muerte de la planta (Denny, 2006b; Milling et al., 2009; Peyraud et al., 2016; Vasse, 1995) (Figura 4). Cuando esto sucede, *R. solanacearum* puede regresar al estado saprofito en el suelo (Graham & Lloyd, 1979a; Paudel et al., 2020).

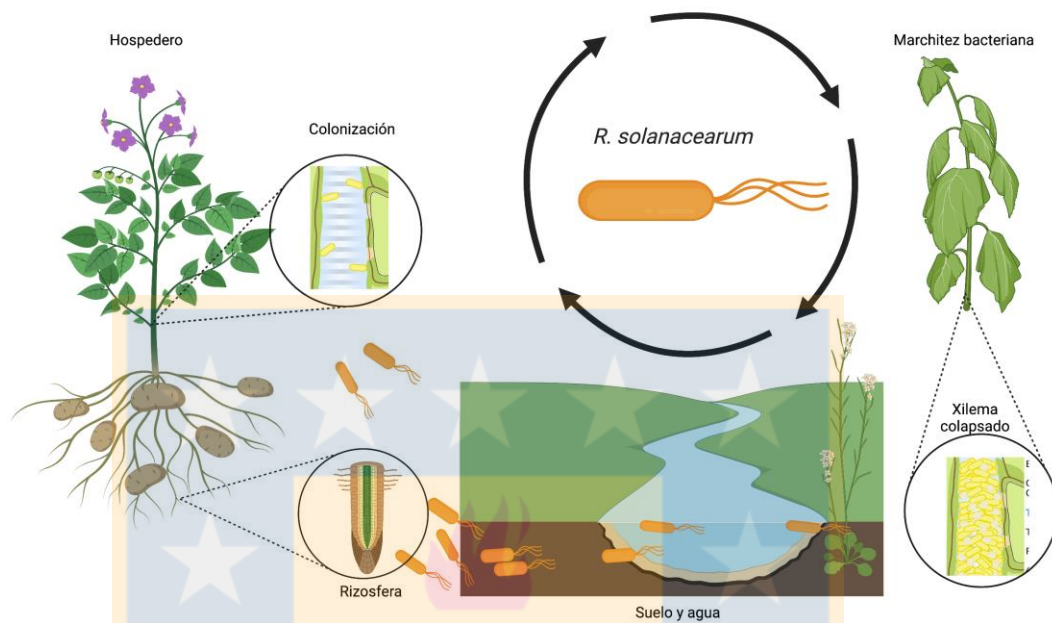


Figura 4. Ciclo de la enfermedad producida por *Ralstonia solanacearum*. *R. solanacearum* puede sobrevivir en suelo, agua y malezas durante largos períodos de tiempo. Una vez que encuentra en las raíces de una planta huésped, *R. solanacearum* ingresa a través de heridas o raíces secundarias, colonizando hasta que entra al sistema vascular de la planta, donde aumenta la densidad produciendo el exopolisacárido que provoca la obstrucción de los vasos del xilema y la obstrucción de la circulación de agua, provocando así los síntomas de marchitamiento y posterior muerte de la planta. Una vez que la planta muere, la bacteria regresa al ambiente como potencial agente infeccioso para otros hospederos (Imagen creada en www.biorender.com).

En el suelo, el tiempo de sobrevivencia de este patógeno puede variar según el contenido de humedad, la temperatura y el tipo de suelo; por lo tanto, todos esos factores pueden jugar un papel crítico en la sobrevivencia de *R. solanacearum* (Patrice G. Champoiseau, 2009b). Además, se ha observado que *R. solanacearum* no sobrevive en el suelo a granel lejos del material vegetal, excepto por cortos períodos de tiempo (Bamford et al., 2017; Grey & Steck, 2001; Scherf et al., 2010), y que su sobrevivencia a largo plazo en el suelo podría estar asociada a la capacidad del organismo para infectar

las raíces de los huéspedes, o a la capacidad de colonizar la rizosfera de especies no huéspedes (Graham & Lloyd, 1979b). Sin embargo, también se ha reportado que *R. solanacearum* posee una mayor sobrevivencia en capas de suelo más profundas, presuntamente debido a una menor fluctuación de la temperatura, así como a un menor grado de depredación por protozoos o de competencia/antagonismo por la microbiota del suelo (Graham & Lloyd, 1979b)

Además de sobrevivir en el suelo durante períodos prolongados, *R. solanacearum* también puede sobrevivir en corrientes de agua, a través de las cuales puede propagarse e infectar otros lugares (J. C. Hong et al., 2008). Las características que presenta el agua como la temperatura, pH y salinidad influyen en la capacidad de la bacteria para sobrevivir en el medio acuático. Ante esto, se ha demostrado que la bacteria prolifera en ciertas malezas terrestres y cuerpos de aguas las que no muestran síntomas de marchitez, pero sí se ha logrado detectar *R. solanacearum* en tallo y raíces (J. Hong et al., 2005).

En cualquiera de los casos, *R. solanacearum* es capaz de cambiar su metabolismo como mecanismo de sobrevivencia frente a inanición y en presencia de agentes antimicrobianos (Martins et al., 2018), a un estado inactivo reversible denominado dormancia, el que permite una inhibición transitoria del crecimiento a través de la inactivación de las principales funciones celulares (Lewis, 2007, 2008, 2010a; Mori et al., 2018a; Pu et al., 2017).

El estado de dormancia presenta dos fenotipos: i) viable pero no cultivable (VBNC por sus siglas en inglés) que se define por el fracaso de un organismo para ser cultivado en medios que normalmente favorece su crecimiento y ii) como estado de persistencia que se refiere a las subpoblaciones tolerantes a múltiples fármacos y distintas condiciones, incluyendo exposiciones extremas a cambios de temperatura, humedad y salinidad (Flemming et al., 2016; Wood et al., 2013). Las células persistentes y las VBNC comparten características moleculares, reguladas por diferentes vías metabólicas (Bamford et al., 2017). En *R. solanacearum*, se ha observado que el fenómeno de VBNC ocurre cuando es sometida a bajas temperaturas (4°C) y en presencia de metales pesados (Grey & Steck, 2001).

Por ejemplo, células tolerantes a los antibióticos muestran este fenotipo aproximadamente entre 0.001–0.1% de las células en una población bacteriana, y este número puede aumentar hasta un 1% en fase estacionaria o en agregados celulares multiespecie llamados biopelículas (Lewis, 2008, 2010a). Esta es una importante estrategia de supervivencia bacteriana frente a la privación de nutrientes, cambios de pH, temperatura, radicales libres de oxígeno, desinfectantes y antibióticos (Jefferson, 2004).

Las estrategias de supervivencia de *R. solanacearum* han creado dificultades y limitaciones en los planes de manejo a través de medidas preventivas, medios de cultivos, así como métodos químicos, físicos y biológicos (Yuliar et al., 2015). Las medidas preventivas, tales como la cuarentena, prácticas fitosanitarias, uso de semilla certificada libre de la enfermedad, desinfección de equipos y herramientas, uso controlado del riego por inundación, y evitar el riego por aspersión, han tenido éxito

solamente donde el patógeno no está presente, ya que de lo contrario no son aplicables en lugares infectados (Karim & Hossain, 2018).

Dada esta característica, la supervivencia a largo plazo de *R. solanacearum* depende del cultivo bacteriano, pero su detección dependerá de su estado VBNC, estado que influirá en la determinación de la presencia del patógeno, sobre todo en la evaluación del éxito de las diferentes estrategias de control, como lo indicaría la ausencia del patógeno en un medio de crecimiento apropiado (Kong et al., 2014).

La determinación de células VBNC requiere el uso de ensayos de viabilidad independiente del crecimiento. Los ensayos de viabilidad comunes utilizados para enumerar células viables miden la actividad metabólica o la presencia de ARN, ATP o una membrana celular intacta (Ghezzi & Steck, 1999). Para caracterizar células en estado VBNC, se debe considerar la capacidad de recuperación del cultivo. Para ello, se han utilizado autoinductores microbianos y antioxidantes con el fin de eliminar el estrés de estos cultivos (Baffone et al., 2006; Li et al., 2014; Robben et al., 2018). En *R. solanacearum* ha sido exitosa la utilización de catalasa como mecanismo de reanimación del patógeno (Kong et al., 2014; Tondo et al., 2020).

Como consecuencia de estas estrategias de supervivencia, es que existen dificultades en su aislamiento y determinación, lo que influye en el correcto diagnóstico de la enfermedad.

1.3. Diagnóstico de *Ralstonia solanacearum*

Los síntomas de marchitamiento bacteriano/podredumbre parda causados por *R. solanacearum* pueden confundirse con otros síntomas de marchitamiento causados por *Fusarium spp.*, *Verticillium spp.*, *Erwinia chrysanthemi* y *Clavibacter michiganensis subsp. Sepedonicus*. Por lo tanto, el diagnóstico definitivo siempre debe obtenerse mediante pruebas de laboratorio en un cultivo puro (EPPO, 2004).

En principio, la identificación y caracterización de especies bacterianas se realiza en gran medida en base a fenotipos bacterianos como morfología, crecimiento de colonias y características metabólicas que dependen del aislamiento y tipo cultivo (ClarridgeIII, 2004). Dentro de ellos, se ha utilizado la tinción Gram y la observación microscópica que permite una evaluación preliminar de las bacterias presuntamente presentes (Chakravorty et al., 2007; Rizal et al., 2020).

Si bien estos métodos continúan utilizándose, las técnicas de base molecular han proporcionado conocimientos sobre la identificación y tipificación bacteriana. Es así que varios organismos internacionales como USDA (United States Department of Agriculture) y EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization) han elaborado protocolos de diagnóstico de *R. solanacearum* (Anonymous, 2006; Floyd, 2008), así como también están disponibles en el Concilio de la Unión Europea Directivo 98-57-EC. Los métodos recomendados incluyen: bioensayos, cultivo en medios semi-selectivos, técnicas serológicas y moleculares. Cada método presenta sus ventajas y limitaciones en lo que refiere al límite de detección, especificidad, rapidez, aplicabilidad y costos.

Para *R. solanacearum* se usan protocolos de aislamiento clásico utilizando uno o varios medios semi-selectivos, como “medio selectivo de Sudáfrica” (SMSA-E, por sus siglas en Ingles, (Elphinstone, 1996b; Obrador-Sánchez et al., 2017) y SM-1 (Granada y Sequeira 1983) que restringen el crecimiento de hongos, bacterias Gram positivas y ciertas bacterias Gram negativas saprofitas, excluyendo *R. solanacearum* dado que se encuentra presente el antibiótico polimixina B en la concentración más alta, el cual ha sido reportado que en la familia de *R. solanacearum* muestra resistencia (Elphinstone, 1996b). Además, como una manera de evaluar sus características morfológicas, los cultivos se siembran en medio cloruro de trifenetrazolio (TZC; por sus siglas en ingles) y las colonias fluidas bien aisladas se vuelven a sembrar en placas de ácido casamino-peptona-glucosa (CPG; por sus siglas en inglés), debido a que algunas cepas son sensibles al pigmento de formazán producido para TZC (Obrador-Sánchez et al., 2017; Patrice G. Champoiseau, 2009b).

Sin embargo, se ha reportado que esta metodología no resuelve el aislamiento de *R. solanacearum* axénico, obteniendo co-cultivos de otros microorganismos (Kalpage & Costa, 2015; Patrice G. Champoiseau, 2009a), dentro de los que se describe la presencia de bacterias endófitas de papa de los géneros *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Pseudomona* (Obrador-Sánchez et al., 2017; Sarkar & Chaudhuri, 2015) cuyos fenotipos (velocidad de crecimiento, morfología macro y microscópica, y características metabólicas) son muy similares al de *Ralstonia*. Tal motivo sugiere complementarlos con herramientas moleculares para su identificación y clasificación (Franco-Duarte et al., 2019).

En las últimas décadas, las herramientas utilizadas en biología molecular se han reformado para identificar bacterias patógenas de plantas, siendo la más utilizada el análisis de secuencia del gen del ADN ribosomal 16S (16S ADNr) para identificar especies bacterianas y realizar estudios taxonómicos (Chakravorty et al., 2007).

1.4. Gen ADNr 16S

Los genes de ADNr o denominados también operones ribosomales (rrn) de células procariotas incluyen específicamente las regiones 5S, 16S y 23S, regiones intergénicas y también pueden contener genes de ARNt del ribosoma (Church et al., 2020) (Figura 5). Las regiones 5S, 16S y 23S están caracterizadas de acuerdo a sus longitudes en aproximadamente 3300, 1550 y 120 nucleótidos, respectivamente (Rosselló-Mora & Amann, 2001).

Los genes que codifican los componentes del ribosoma han sido en su mayoría conservados evolutivamente (Fukuda et al., 2016), y han sido utilizados para la clasificación taxonómica de tres dominios de organismos presentes en el planeta Tierra (Eukarya, Bacteria y Archaea) (Church et al., 2020). De ellos, es el gen ADNr 16S se ha convertido en un estándar en la clasificación taxonómica, el cual se compone por ocho regiones altamente conservadas y nueve regiones variables (Figura 5). Las regiones variables tienen diferente poder discriminatorio en función de los grupos bacterianos, donde la región hipervariable 4 (V4) fue generalmente la más informativa (D'Amore et al., 2016).

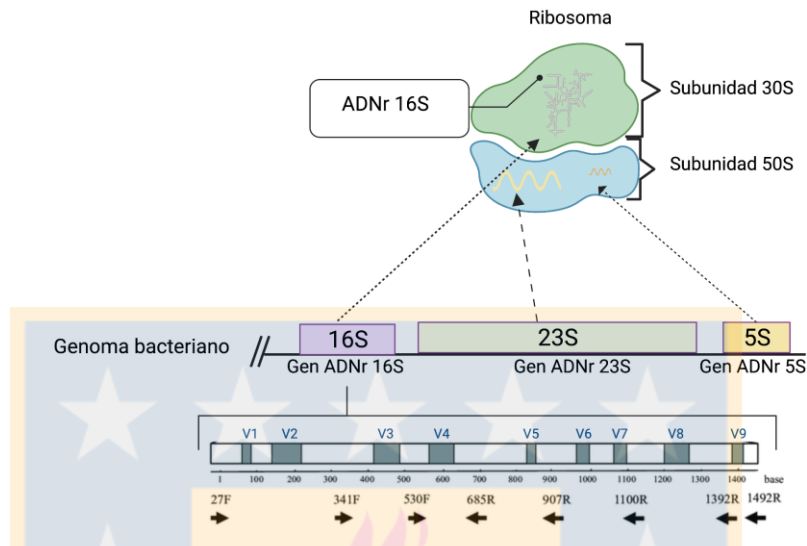


Figura 5. Esquema del complejo ribosómico y el gen ADNr 16S. Los cuadros blancos y grises indican regiones conservadas y regiones hipervariables, respectivamente. Las flechas en negrita se muestran las posiciones aproximadas de los partidores universales en la secuencia del gen de ADNr 16S de la especie modelo *Escherichia coli* (Imagen adaptada de (Yarza et al., 2014) y generada en www.Biorender.com).

Además, el gen ADNr 16S puede estar presente entre 1-15 copias por genoma bacteriano (Klappenbach et al., 2000; Mansfield et al., 2012), reportando por ejemplo que más del 80% de los genomas bacterianos secuenciados tienen más de un operón (Espejo & Plaza, 2018).

El número de operones ribosomales permite predecir la tasa de crecimiento, y la eficiencia del crecimiento es dependientes de la disponibilidad de recursos (Roller et al., 2016). Sumado a esto, algunas copias pueden diferir (Baker et al., 2003; Chakravorty et al., 2007; Church et al., 2020), con diferencias de nucleótidos entre las secuencias del gen ADNr 16S de <1% de divergencia (Acinas et al., 2004).

El origen de los distintos tipos de genes de ADNr en un organismo ha sido atribuido a la evolución divergente luego de la duplicación de estos genes o a la transferencia horizontal de genes similares desde otras cepas relacionadas (Acinas et al., 2004). Esta heterogeneidad intragénomica ha permitido la sub-tipificación entre especies (Sun et al., 2013), pero a su vez puede llevar a una sobre-estimación de la abundancia y diversidad bacteriana utilizando enfoques independientes de los métodos de cultivo (Acinas et al., 2004).

1.5. Bases de datos del gen ADNr 16S

Cada una de estas secuencias del gen ADNr 16S está disponible en las bases de datos públicas, pero se debe evaluar la cobertura de la secuencia y la confiabilidad de la anotación (Church et al., 2020). Dentro de ellas se encuentra GenBank (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) que contiene actualmente >29.000.000 de entradas para secuencias del gen ADNr 16S de diversas longitudes y calidades derivadas de una amplia gama de bacterias recuperadas de diversos ambientes (Church et al., 2020). Pero, esta base de datos no garantiza la selección de la secuencia correcta y el contenido de las anotaciones, sobre todo cuando las secuencias del ADNr 16S de las cepas bacterianas depositadas son usualmente obtenidas de un solo clon de un operón o del total del ADNr 16S.

A pesar de esta limitación, son cada vez más genomas procariontes parciales y completos disponibles que contienen secuencias ADNr 16S completas (Church et al., 2020). Actualmente, existen tres bases de datos estándares para el gen ADNr 16S. Estas bases de datos son Greengenes (DeSantis et al., 2006) con 1.200.000 secuencias, SILVA (Quast et al., 2013) con 5.200.000 secuencias, y RDP (Cole et al., 2014) con 3.200.000 secuencias (Balvočiūtė & Huson, 2017). De entre ellas, la base de datos SILVA se caracteriza por ser ampliamente utilizada para los estudios que utilizan el gen ADNr 16S (Balvočiūtė & Huson, 2017) y se ha sugerido en diversos análisis de comparación de bases de datos por proporcionar las tasas de error más bajas y la precisión por lectura más alta, independientemente del software utilizado en la clasificación (Lu & Salzberg, 2020). Esto se debe a que las bases de datos de genes SILVA utiliza un enfoque de curación manual guiado por árboles filogenéticos para la taxonomía de Bacteria, aproximación que se basaban en los esquemas taxonómicos de Bergey (Yilmaz et al., 2014).

1.6. Secuenciación del gen ADNr 16S y su uso en la determinación filogenética y taxonómica de bacterias

Dada la presencia del gen ADNr 16S en todas las bacterias, este gen se utiliza tanto para la determinación de aislamientos bacterianos puros como para la identificación de muestras complejas procedentes de una variedad de entornos (Winand

et al., 2019); por ejemplo, muestras de suelo y ambientes acuáticos obteniendo datos tanto de su composición bacteriana como también abundancia y riqueza (ClarridgeIII, 2004).

A pesar de su recurrente uso, la secuenciación del gen ADNr 16S para la identificación bacteriana se ve afectado por varios factores, como las regiones del gen consideradas y su eficiencia de amplificación, la tecnología de secuenciación, y los flujos de trabajo bioinformáticos empleados. Como resultado, la probabilidad de una identificación correcta de especies varía sustancialmente entre géneros y especies en función de la similitud de su secuencia (Beye et al., 2017). En 1994, se consideraba que dos cepas pertenecían a especies diferentes si compartían valores de similitud de secuencia del gen ADNr <97% y a un género distinto si este valor era <95% (Stackebrandt & Goebel, 1994). El valor de corte a nivel de especie fue reevaluado posteriormente al 98,7% y luego al 98,65% (Yarza et al., 2014).

La correcta asignación taxonómica y relaciones filogenéticas de las bacterias se basa en los niveles de similitud entre las secuencias del gen ADNr 16S de longitud completa (~1540 pb). La amplificación de la longitud completa de este gen se logra utilizando los partidores, denominados 27F y 1492R, en la reacción de PCR y secuenciando mediante la secuenciación de tipo Sanger (Mardis, 2017). Sin embargo, este método es propenso a errores dentro de las primeras y últimas 15-45 nucleótidos (nt) de las secuencias, produciendo datos de baja calidad debido a la unión del partidador (Ebili et al., 2017).

Para poder extender la metodología Sanger a un método masivo, en paralelo, y a un costo reducido (Goodwin et al., 2016), surgió la secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en ingles). El primer sistema NGS de segunda generación disponible fue la plataforma de secuenciación por pirosecuenciación 454 de Roche (Ronaghi, 2001). Luego emergieron sistemas que incluyen a Illumina (derivado del sistema conocido como Solexa) HiSeq/MiSeq/NextSeq/NovaSeq, ABI SOLiD y Life Technologies Ion Torrent (Persing et al., 2016).

Las tecnologías NGS pueden demostrar una capacidad de rendimiento significativamente alta, pero son inferiores al método Sanger en términos de la longitud de lectura y precisión (Rizal et al., 2020). Actualmente, la secuenciación MiSeq (Illumina) es la plataforma más utilizada para la secuenciación de amplicón del gen ADNr 16S que es usado en análisis de comunidades microbianas (Winand et al., 2019). La PCR se lleva a cabo en las regiones variables únicas (V2, V3 y V4) o combinadas (V1V2, V3V4, V4 y V5V6) de las bacterias, y los partidores se centran en la región conservada del gen ADNr 16S (Winand et al., 2019). Tanto la región a amplificar como los partidores utilizados pueden determinar la taxonomía de una muestra ambiental (Fouhy et al., 2015; Woo et al., 2008), pudiendo traer como consecuencias una cobertura taxonómica que puede ser limitada o una representación excesiva o insuficiente de los taxones en un entorno específico, debido a sesgos en la amplificación de los partidores que podrían conducir a resultados poco confiables (Haro et al., 2021).

Comúnmente se ha sugerido la amplificación de la región V3V4 para muestras ambientales (Winand et al., 2019), dado que estas regiones contienen la máxima heterogeneidad de nucleótidos y muestran el máximo poder discriminatorio (Klindworth et al., 2013). A pesar de ser la región más utilizada, nuevos estudios han sugerido la utilización a la región V1V3 (W. Zheng et al., 2015) y V4-V5 (Fadeev et al., 2021). Sin embargo, no son regiones probadas sistemáticamente en las comunidades microbianas.

Una vez amplificada la región hipervariable, las secuencias amplificadas se agrupan computacionalmente y se identifican mediante el agrupamiento de unidades taxonómicas operativas (OTU por sus siglas en inglés) (Peterson et al., 2021). Este es un método que agrupa secuencias en función a su porcentaje de similitud. Recientemente, métodos como la identificación de variantes de secuencia de amplicón (ASV) (Callahan et al., 2016), o unidad taxonómica sub-operacional (sOTU) (Amir et al., 2017) han sido propuestos para identificar secuencias únicas y eliminar lecturas de baja calidad y quimeras de secuencia (Peterson et al., 2021). Sin embargo, la aproximación a través de OTUs sigue siendo la más usada en la comunidad científica.

Actualmente, la detección y clasificación de cepas pertenecientes al complejo RSSC se realiza en gran medida mediante la amplificación, secuenciación, y comparación del gen ADNr 16S con bases de datos públicas. Esta aproximación ha sido utilizada ampliamente para identificar especies bacterianas dentro del complejo y realizar estudios taxonómicos (Chakravorty et al., 2007; J. Zheng et al., 2021). Algunos resultados que han utilizado esta estrategia de determinación, han identificado aislamientos en co-cultivo, por ejemplo con especies pertenecientes al grupo *Enterobacteriaceae* disponibles en GenBank, donde menos del 5% de ellos podría ser

R. solanacearum (Sarkar & Chaudhuri, 2015). Adicional a esta investigación, se ha confirmado el aislamiento del patógeno con un porcentaje de similitud <99% (Hossain et al., 2021; She et al., 2017a) y entre 95-98% (Umadevi et al., 2021). En estos estudios se consideró una similitud mínima generada por las variaciones presentes en las cepas como criterio suficiente para no clasificar a *R. solanacearum* como una especie diferente, sin considerar la heterogeneidad entre las copias múltiples del gen ADNr 16S que existen en los genomas de *Ralstonia* y que podrían afectar la taxonomía de los aislamientos.

En este contexto, es que, si bien existe una metodología tradicional para el aislamiento y caracterización de *R. solanacearum*, aún existen grandes desafíos en su interpretación y sensibilidad, debido a que los medios utilizados para su aislamiento no son selectivos exclusivamente para *R. solanacearum* y se corrobora que el uso de genes constitutivos como el ADNr 16S, no es una herramienta sensible respecto a su actual análisis e interpretación, la que podría limitar los estudios sobre las distintas estrategias de control de la enfermedad que este patógeno produce.

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Permiten los medios semi selectivo SMSA-E aislar principalmente cepas de *Ralstonia solanacearum* axénica?

¿Los partidores universales (27F-1492R) que amplifican las regiones V1-V9 del gen ADNr 16S permiten discriminar en forma selectiva cepas de *Ralstonia solanacearum*?

3. HIPÓTESIS

La estrategia basada en medio semi selectivo (SMSA-E) no selecciona en forma específica a cepas de *Ralstonia solanacearum*.

Los partidores universales si permiten determinar taxonómicamente en forma selectiva todas las copias del gen ADNr 16 de las cepas de *Ralstonia solanacearum*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Desarrollar una propuesta metodológica para la caracterización molecular específica de *Ralstonia solanacearum* basada en el marcador molecular ADNr 16S.

4.2. Objetivos específicos

1. Determinar la sensibilidad de la metodología basada en aislamiento selectivo y en la amplificación de una copia del ADNr 16S para la identificación de *Ralstonia solanacearum* axénica.
2. Implementar una aproximación bioinformática para establecer nuevos marcadores moleculares específicos en base a todas las copias del gen ADNr 16S para la identificación de *Ralstonia solanacearum*.

5. MATERIALES

5.1. Medios de cultivo

Medio Semi-selectivo Sudáfrica modificado, SMSA (1 litro) (Elphinstone, 1996b):

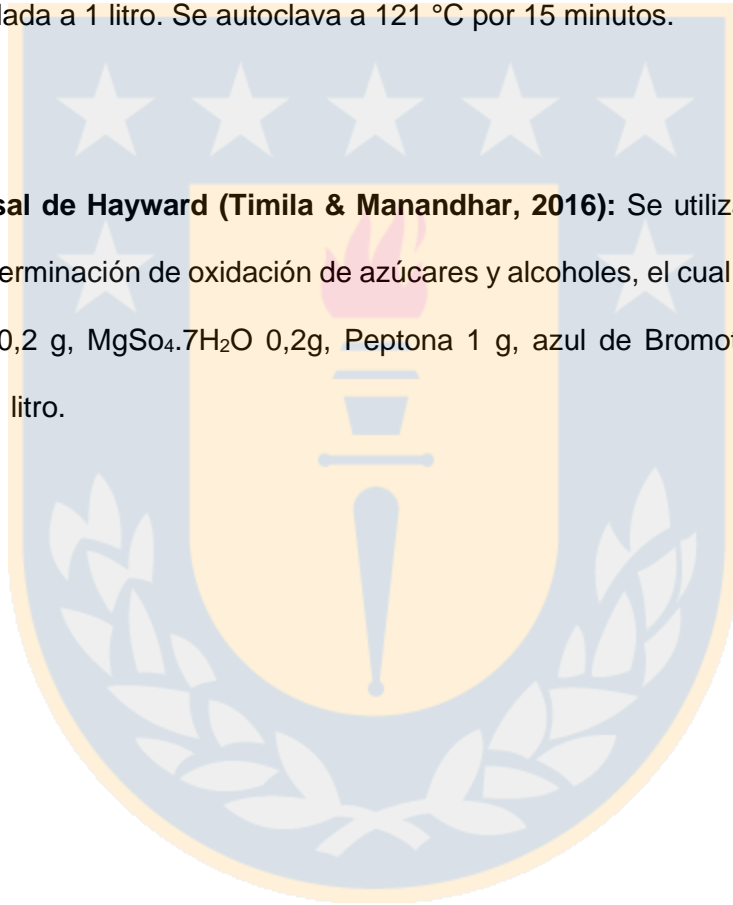
Caseína hidrolizada 1 g, Peptona 10 g, Glicerol 1 mL, Agar 17 g, Triphenyl tetrazolium chloride (TZC) 5 mL (se agrega luego del proceso de esterilización en autoclave). Luego se disolvió en 5 mL de etanol al 70% por 30 minutos cada uno de los componentes siguientes por aparte: Cristal violeta 5 mg, Polymyxin β sulfato 100 mg, Bacitracina 25 mg, Cloromicetina 5 mg, Penicilina 0,5 mg, Cicloheximida 100 mg. Estos se disolvieron antes de ser agregados al medio autoclado.

CPG-TZC (1litro) (Granada y Sequeira 1983): Caseína hidrolizada 1 g, Peptona 10 g, Glucosa 5 g, Agar 17 g, Extracto de levadura 1 g, Triphenyl tetrazolium chloride (TZC) 5 mL (se agrega luego del proceso de esterilización en autoclave).

5.2. Soluciones

Tampón fosfato salino (PBS): Este tampón se utiliza para la resuspensión y dilución de los aislamientos. Contiene $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,7 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,4 g, NaCl 8 g y agua destilada a 1 litro. Se autoclava a 121 °C por 15 minutos.

Medio basal de Hayward (Timila & Manandhar, 2016): Se utiliza como medio basal para la determinación de oxidación de azúcares y alcoholes, el cual contiene: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 g, KCL 0,2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2g, Peptona 1 g, azul de Bromotimol 10,2 mL, agua destilada 1 litro.



6. METODOLOGÍA

Objetivo específico 1: Determinar la sensibilidad de la metodología basada en aislamiento selectivo y en la amplificación de una copia del ADNr 16S para la identificación de *Ralstonia solanacearum* axénica.

6.1. Muestreo de tejidos vegetales

En la comuna de Linares, Región del Maule Chile (35°37'50'' S 71° 33'05'' W), se realizó el muestreo en terreno agrícola destinado a plantaciones de papa que fue reportada con la pérdida total de su producción, y que mostraba evidentes síntomas de infección bacteriana. Se recolectaron 12 tubérculos de papa variedad "Red Lady" que presentaban síntomas de pudrición parda con el objetivo de aislar *R. solanacearum*. Las muestras se depositaron en bolsas tipo Ziploc y se etiquetaron con la información del tejido colectado, fecha y sitio de muestreo. Las muestras fueron colocadas en hieleras con geles refrigerantes y enviadas al laboratorio de Microbiología y Biopelículas del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción, donde fueron procesadas.

6.2. Condiciones de crecimiento para el aislamiento de *Ralstonia solanacearum*

Se desinfectó la superficie de los tubérculos sintomáticos sumergiéndolos en hipoclorito de sodio (0.5% de cloro activo) durante 1 minuto y luego con agua estéril. El aislamiento desde los tubérculos consideró dos tipos de muestras: “Muestra RS” se les realizó un corte transversal con un bisturí estéril. Después de presionar el tubérculo, se utilizó un asa estéril para muestrear exudados vasculares y se sembraron directamente en medio SMSA modificado (SMSA-E) que contiene Cristal violeta 5 mg, Polymyxin β sulfato 100 mg, Bacitracina 25 mg, Cloromicetina 5 mg, Penicilina 0,5 mg, Cicloheximida 100 mg (Elphinstone, 1996b; Wei et al., 2017) . Las “Muestras C” se obtuvieron desde tejido vascular necrosado (5 mm-10mm) que fueron resuspendidas en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con Tween-20 (0.01%) por 48 horas en agitación. Desde este cultivo, se ajustó a una concentración de 10^4 UFC/mL y posteriormente se sembró homogéneamente sobre agar SMSA-E (Elphinstone, 1996b; Wei et al., 2017) por 48h a 28°C para el desarrollo de las colonias. Se seleccionaron las colonias con características propias de *R. solanacearum*, y que presentaban consistencia mucoide y color cremoso para su posterior replicación en medio CPG y TZC. Se seleccionaron colonias con características descritas para la especie, y se conservaron en agua estéril y en 30% (v/v) de glicerol (López, et al., 2008). Las suspensiones tuvieron una concentración de 10^7 a 10^8 cel/mL y se almacenaron a -20°C y a -80°C.

6.3. Caracterización fenotípica y bioquímica (parcial) de los aislamientos de *Ralstonia solanacearum*

Se seleccionaron colonias según características descritas para *R. solanacearum*, colonias blanca o color crema con centro rosado cuando está en medio tetrazolio. De manera alternativa, a las colonias positivas para *R. solanacearum* se le realizó la tinción Gram (Timila & Manandhar, 2016) siendo posteriormente observada en el microscopio óptico a 40 y 100X.

Estas características fueron las consideradas para la obtención de cepas de *R. solanacearum*. Para la obtención del *stock* de trabajo, se propagaron todas las cepas a partir del *stock* original de cada una de ellas para obtener un cultivo puro, lo cual se realizó mediante el protocolo descrito por Champoiseau, 2009 publicado en USDA 2009. Brevemente, a partir del *stock* original se realizaron diluciones seriadas con medio CPG líquido hasta 10^{-6} . La viabilidad de estos cultivos se determinó utilizando el kit de viabilidad LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes, Oregon, EE. UU.), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La observación y posterior recuento bacteriano, se realizó mediante tinción de bacterias vivas utilizando un aumento de 100X en microscopio óptico.

Además, las cepas fueron clasificadas según su capacidad de oxidar tres disacáridos (celobiosa, lactosa y maltosa) y dos alcoholes hexosa (manitol y sorbitol). Se agregaron estas soluciones esterilizadas (10% p/v) al medio basal Hayward" (Hayward, 1964a, 1991b) antes de la inoculación de los aislamientos a una concentración de 10^5 UFC/mL. Se observaron las reacciones después de 1, 3, y 7 días de incubación a 28°C;

para luego, evaluar el cambio de color de verde olivo a amarillo, evidenciando la producción de ácido a partir de los disacáridos y oxidación de los alcoholes de hexosa.

6.4. Identificación molecular de aislamientos basados en secuenciación del gen ADNr 16S

Para lograr la identificación de los aislamientos a través de la secuenciación del gen ADNr 16S, se realizó la extracción de ADN genómico de las cepas seleccionadas utilizando el kit PowerSoil DNA Isolation (Mo Bio Laboratories, Inc.), según las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% utilizando una escala de ADN de 1 Kb. La cantidad de ADN genómico extraído se midió mediante Tecan's Spark® multimode microplate.

Se amplificó el gen ADNr 16S usando los partidores universales 27F y 1492R (Weisburg et al., 1991) que comprende las regiones V1 a V9 y una segunda PCR usando partidores 341F y 907R (Fukuda et al., 2016) que incluye a las regiones variables V3 a V6 para obtener la superposición de secuencias entre 27f y 1492r, y así completar la longitud completa del gen ADNr 16S, dando una mayor confiabilidad de la región.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ L con el kit de ADN polimerasa GoTaq Flexi (Promega, EEUU), donde cada reacción de PCR contenía un 1 μ L de ADN y 23 μ L del mix de PCR, compuesto por 5 μ L de tampón Go Taq (Madison Wisconsin, Promega, EE. UU.), 1,5 μ L de $MgCl_2$ (25 mM), 0,5 μ L de dNTP

(10 mM), 1,25 μ L de cada partidor (10 μ M) y 0,125 μ L de GoTaq. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo de la siguiente manera: Pre-denaturación a 94°C durante 2 min, seguido por 30 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s, hibridación por 45 s a 58°C, y elongación a 72°C por 1,5 min; finalmente una post-elongación a 72°C por 5 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,2 % (en tampón TAE 0,5 x). El producto de PCR se envió re-suspendido en agua (grado biología molecular), hacia el Servicio de Secuenciación del Departamento de Ecología, Pontificia Universidad Católica de Chile, para ser secuenciado en un Sanger ABI 3700 (Applied Biosystems®).

6.5. Análisis de secuencias del gen ADNr 16S

Las secuencias obtenidas de los productos de PCR 27f-1492r y 341f-907r fueron ensamblados en una secuencia del gen 16S ADNr de longitud completa usando Unipro UGENE (Okonechnikov et al., 2012) con edición manual de la secuencia de consenso para resolver las discrepancias entre los cromatogramas. La búsqueda de homología se realizó comparando nuestras secuencias consensos con la base de datos pública (NCBI) usando el algoritmo BLASTN. Además, se realizaron múltiples alineaciones usando el programa Clustal W (Thompson et al., 1994) y un árbol filogenético con el programa MEGA v6.0 utilizando el método de reconstrucción filogenética del Vecino Más Cercano o Neighbor-Joining y un bootstrap de 1000.

Objetivo específico 2: Implementar una aproximación bioinformática para establecer nuevos marcadores moleculares específicos en base a todas las copias del gen ADNr 16S para la identificación de *Ralstonia solanacearum*.

6.6. Análisis *in-silico* de las copias de secuencias completas del gen ADNr 16S en genomas bacterianos de interés

Basados en los resultados que entregó el alineamiento de las secuencias en la base de datos NCBI (Objetivo específico 1), se identificaron diferentes especies/cepas de *R. solanacearum* que presentaban un alto porcentaje de similitud con los aislamientos de este estudio. Para obtener las secuencias del gen ADNr 16S de todos los genomas de especies identificadas, se procedió a descargar los genomas completos desde la base de datos de genomas de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>). Además, se incluyeron doce genomas completos del complejo RSSC que también fueron descargados desde GenBank. Estos genomas fueron usados como referencia para los análisis de genómica comparativa. Estos genomas de referencia corresponden a cepas representantes del filotipo IIB: UY031, Po82 y IBSBF1503; filotipo IIA: K60; filotipo I: CQPS-1 y GMI1000; filotipo III: CMR15; y un filotipo IV: PSI07. Así como también se incluyeron representantes de *R. pseudosolanacearum*: RS476 y CRMRs218; y *R. syzygii*: R24 y LLRS-1.

Se incluyeron cepas de genomas de especies del orden de *Pectobacteriaceae* responsables de la pudrición blanda (SRP por sus siglas en inglés) en Chile: *Pectobacterium atrosepticum* (SCRI1043), *Pectobacterium carotovorum* (XP-13), *Dickeya solani* (FB0223) y *Dickeya dadantii* (M2-3) (van der Wolf et al., 2021); así como también dos ejemplares de especies responsables de marchitez bacteriana en los mismos hospederos que *R. solanacearum* tales como: *Erwinia tracheiphila* (MDcuke) en Cucurbitaceae (Shapiro et al., 2018; She et al., 2017b) y *Pantoea stewartii* (ZJ-FGZX1) en maíz (Rahma et al., 2014), hospedero que actúa como reservorio para *R. solanacearum* (Álvarez, Vasse, et al., 2008).

La predicción de genes se realizó con el programa Prokka (Seemann, 2014), utilizado de forma local. Los genes ADNr 16S fueron identificados con el programa Barrnap v3 (<http://www.vicbioinformatics.com/software.barrnap.shtml>) y al mismo tiempo se comprobó la presencia de estos genes de manera manual.

6.7. Estudio genómico comparativo y análisis filogenético

Para examinar la similitud de las copias del gen ADNr 16S de todas las especies, en conjunto con las secuencias analizadas en este estudio, se alinearon de forma múltiple mediante el programa T-Coffee utilizando los parámetros por defecto (Notredame et al., 2000). La visualización de la comparación genómica se analizó a través del programa Unipro UGENE v1.25.0 (Okonechnikov et al., 2012a), el cual

permitió identificar regiones en común entre todas las muestras y zonas que permitían diferenciar *R. solanacearum* del resto de las secuencias que correspondían a otras especies de bacterias.

Posteriormente, para agrupar los genes ADNr 16S en "copias únicas", utilizamos el programa SNP-sites (<https://github.com/sanger-pathogens/snp-sites>) para exportar una lista de variantes y clasificar las copias según cada variante.

Para el análisis filogenético se utilizó el método de Máxima Verosimilitud (ML) de RaxML v8.2.12 (Stamatakis, 2014) con un valor de bootstrap de 1000. Para visualizar los árboles filogenéticos consenso generados por RAxML se utilizó el programa FigTree v1.4.2 (<http://evomics.org/resources/software/molecular-evolution-software/figtree/>).

6.8. Diseño de partidores de la región hipervariable del gen ADNr 16S para identificar de manera especie-específica a *Ralstonia solanacearum*

Con referencia a los estudios anteriores que definieron las regiones variables en *Escherichia coli* (Baker et al., 2003), se asignaron las regiones variables y conservadas en *Ralstonia solanacearum*. Para ello, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con el programa T-Coffee entre cepas de *E. coli* y *R. solanacearum*. Este alineamiento fue visualizado con el programa UGENE software v1.25.0 (Okonechnikov et al., 2012b), permitiendo observar la homología de secuencias entre especies y definir las regiones únicas, específicas y conservadas en *R. solanacearum*.

Las regiones conservadas se utilizaron para diseñar partidores, que se encontraban flanqueando la región variable de interés. Para su diseño se consideraron partidores entre 20-25 pb, una T_m entre 55 y 60°C, y con una diferencia $<2^\circ\text{C}$ para evitar la formación de heterodímeros. Para el diseño de partidores se utilizó el programa genscript (<https://www.genscript.com/tools/dna-sequencing-primer-design>). La ubicación de los partidores en la secuencia completa del 16S RNAr fue corroborada con el programa Primer Map (https://www.genscript.com/sms2/primer_map.html). Una vez obtenida la secuencia de los partidores y haber realizado el BLAST en contra de la base de datos NCBI a cada uno de los partidores para evaluar su especificidad, se encargó su síntesis a la empresa IDT (Integrative DNA Technologies).

La validación de los partidores diseñados fue realizada a través de amplificación por PCR con el Kit GoTaq G2 flexi DNA polymerase de la compañía Promega, catálogo M7801, según recomendaciones del fabricante (MgCl_2 2uM, oligos sentido y anti-sentido 0.5uM, mix de oligonucleótidos 0.4mM). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo de la siguiente manera: Pre-denaturación a 95°C durante 2 min, seguido por 35 ciclos de denaturación a 95°C por 30 s, hibridación por 40 s a 55°C, y elongación a 73°C por 90 s; finalmente una post-elongación a 73°C por 5 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1,2 % (en tampón TAE 0,5 x).

6.9. Análisis de las regiones hipervariables del gen ADNr 16S para el estudio de la comunidad bacteriana de *Ralstonia solanacearum*

6.9.1. Colección de muestras, extracción de ADN y secuenciación de la región variable del gen ADNr 16S

Un muestreo aleatorio de suelo agrícola que contenía los tubérculos con síntomas de pudrición parda y agua (2 litros) de vertiente que desembocaba en el mismo terreno, consideradas ambas como posible fuente de diseminación de *R. solanacearum*, fue realizado. Las muestras de suelo fueron depositadas en bolsas tipo Ziploc, mientras que las muestras de agua fueron colocadas en envases de vidrio. Ambos tipos de muestras fueron preservadas en hielo para su posterior procesamiento en el Laboratorio de Biopelículas y Microbiología Ambiental del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción.

Las muestras de suelo se hicieron por duplicado, mediante un prelavado con PBS y posterior sonicado por 2 minutos. Por otro lado, las muestras de agua fueron filtradas a través de membranas de policarbonato con un tamaño de poro de 3 y 0,2 μm y un diámetro de 25 mm.

El ADN genómico de las muestras de suelo y agua se extrajeron a partir de 1 g de muestra de suelo y 2 membranas de policarbonato que contenían 2 litros de agua. Para la extracción de ambas muestras se utilizó el kit de extracción DNeasy PowerSoil

(Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el ADN fue almacenado en buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH 8,0) y conservado a -80 °C. La extracción se visualizó a través de una electroforesis en gel de agarosa 1,2% (p/v) en buffer TAE 1X (Tris-HCl 40mM, ácido acético 20mM, EDTA 1 mM) y un voltaje constante de 110V durante 30 min. Además, se cuantificó y evaluó su pureza mediante equipo Tecan's Spark® multimode microplate.

Los servicios de secuenciación fueron solicitados a MacroGen (Korea) (<http://www.macrogen.com/>), con el fin de obtener \pm 50 millones de lecturas por cada muestra y réplica. La amplificación se realizó en la región del gen ADNr 16S V3-V4, utilizando los partidores Bakt_341F y Bakt_805R. La secuenciación se realizó mediante la plataforma MiSeq (Illumina), obteniendo secuencias de tipo paired-end de una longitud de 301 pb.

6.9.2. Evaluación de las bases de datos del gen ADNr 16S

Se descargaron las tres últimas versiones disponibles de la base de datos SILVA, las que corresponden a las versiones 128, 132, y 138 (Quast et al., 2013) con el objetivo de evaluar los cambios evolutivos de *R. solanacearum* y especies de interés encontradas en el aislamiento bacteriano de este estudio. Estas bases de datos fueron analizadas mediante el programa Sankey (sankeymatic.com).

6.9.3. Análisis bioinformático para determinar la asignación taxonómica de las secuencias del gen ADNr 16S y análisis de diversidad

El proceso de asignación taxonómica para las secuencias del gen ADNr 16S se realizó utilizando el programa Qiime2, v2-2020.2 (Bolyen et al., 2019). Las secuencias crudas obtenidas en la secuenciación Illumina MiSeq fueron demultiplexadas utilizando Qiime2. La identificación de la calidad de las secuencias fue realizada utilizando el programa FastQC, que es parte del programa Qiime2, y los resultados fueron visualizados mediante Qiime2-viewer. Para el proceso de eliminación de secuencias de baja calidad, se consideró un Phread estimado de 30. Este proceso junto con la obtención de variantes de secuencias de amplicón (ASV; por sus siglas en inglés), se realizó utilizando el programa DADA2 (Callahan et al., 2016). Consideramos trabajar con ASVs, ya que los OTUs en los resultados hacen referencia a secuencias 100% idénticas (zOTU; zero-radius OTU). Finalmente, la clasificación taxonómica se realizó usando como referencia la base de datos del gen ADNr 16S de SILVA v132 (arb-silva.de).

Para el análisis de alfa-diversidad, los índices calculados (n° observado de ASVs, cobertura, índice Chao1 e índice de Shannon) se obtuvieron utilizando la herramienta "Alpha-diversity" en Qiime2. A partir de las tablas de cuentas y la taxonomía asociada obtenida mediante Qiime2, se hicieron gráficos de abundancia a nivel de los taxones de interés y esto se realizó mediante el paquete de R ggplot2.

7. RESULTADOS

Objetivo específico 1: Determinar la sensibilidad de la metodología basada en aislamiento selectivo y en la amplificación de una copia del ADNr 16S para la identificación de *Ralstonia solanacearum axenica*.

7.1. Características fenotípicas y bioquímicas de los aislamientos bacterianos

Se realizaron 36 aislamientos desde los 12 tubérculos de papa que presentaban síntomas de marchitez bacteriana, cada uno sembrado en los tres medios de cultivo (SMSA-E, CPG y TZC). De estos sembrados, se seleccionaron 40 colonias, cuyas características correspondían a colonias viscosas, blancas, irregulares y fluidas con una coloración rosa-roja en el centro (Figura 6). El número máximo de colonias se obtuvo después de 48 horas de incubación, sin aumento después de 72 horas.

A las 40 colonias se les realizó tinción Gram. De ellas, sólo 14 aislamientos fueron identificados como bacterias Gram negativas puras. Estos aislamientos almacenados tanto en agua como glicerol, se comprobó que sólo las células almacenadas en agua a -20°C fueron cultivables.

A los 14 aislamientos se les realizó la determinación del metabolismo oxidativo/fermentativo de 5 de 6 carbohidratos propuestos para la identificación de biovares, el cual se realizó de acuerdo a señalado por Hugh y Leifson (1953). La reacción de oxidación fue indicada por el cambio de color. Los resultados revelaron el cambio de

color azul a amarillo indicando la oxidación de azúcares por bacterias. Las pruebas bioquímicas mostraron resultados diferentes para todas las cepas sugiriendo que las cepas aisladas podrían corresponder a cultivo bacteriano perteneciente al menos a tres grupos diferentes, y que podrían corresponder al perfil del biovar 2, 3 y 4 (Figura 6).

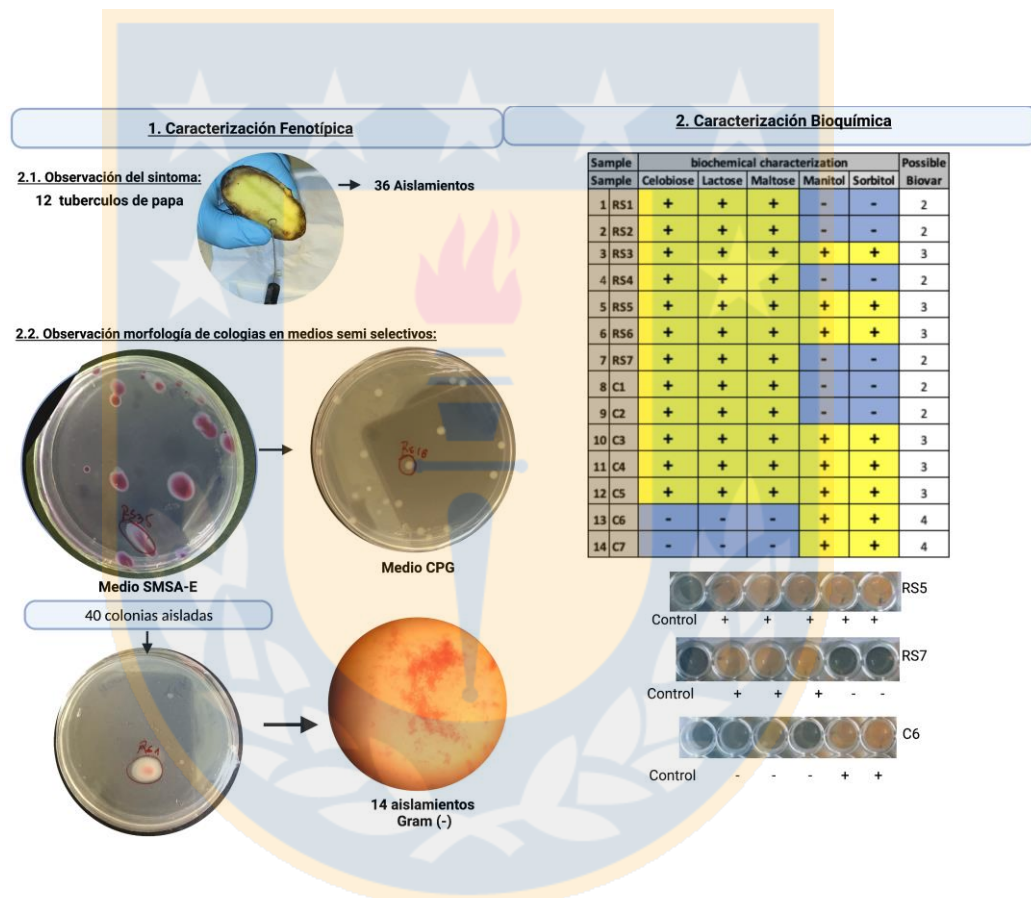


Figura 6. Resultados de la caracterización fenotípica y bioquímica de los aislamientos bacterianos desde tubérculos de papa. Para la caracterización fenotípica (1) se seleccionaron tubérculos con sintomatología de infección bacteriana. (1.1) Se observa la sección transversal de un tubérculo infectado con *R. solanacearum* que muestra una decoloración parcial de color marrón grisáceo de tejidos vasculares, y un típico exudado cremoso blanco o supuración a lo largo del anillo vascular. (1.2) Para la morfología de colonia típica de *R. solanacearum* en agar de cloruro de tetrazolio (TZC y SMSA-e) tras incubación 72 h a 28°C: colonias de forma irregular, fluidas y enteramente blancas o con un centro rosa (Kelman, 1954) y en agar CPG que muestra pequeñas colonias redondas de color crema. La selección final fue en base a los resultados de la tinción Gram. Para la caracterización bioquímica (2) se observó el cambio de coloración de verde a amarillo para considerar una reacción positiva.

7.2. Análisis molecular de los aislamientos bacterianos

Los productos de PCR del gen ADNr 16S de los 14 aislamientos seleccionados fueron secuenciados y sus cromatogramas fueron analizados para asignar correctamente las bases nitrogenadas y reconstruir la secuencia consenso de cada muestra (Figura 7A) (Ver Anexo 1: Secuencias completas). De estas secuencias, 13 de 14 fueron identificadas con un 95% de similitud a las siguientes especies: *Serratia grimesii*, *Klebsiella Aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Kluyvera intermedia*, *Pseudomonas thivervalensis*, *Enterobacter mori*, *Enterobacter ludwigii* y *Lelliottia amnigena*; y sólo un aislamiento fue identificado con un 100% de similitud a *R. solanacearum*: RS7. Los aislamientos que utilizaron la metodología de aislamiento tradicional desde un corte necrosado (Muestras C) presentaron una alta similitud (>99%) con *Serratia grimesii* y las muestras provenientes desde aislamiento de siembra directa desde mucosidad bacteriana (Muestras RS) tuvieron una mayor similitud con *Kluyvera intermedia* (>99%) (Figura 7B). Desde este aislamiento realizado directo desde mucosidad fue posible determinar la presencia de *R. solanacearum* de manera axénica.

A. Reconstrucción de secuencia

B. Identificación bacteriana por similitud de secuencias

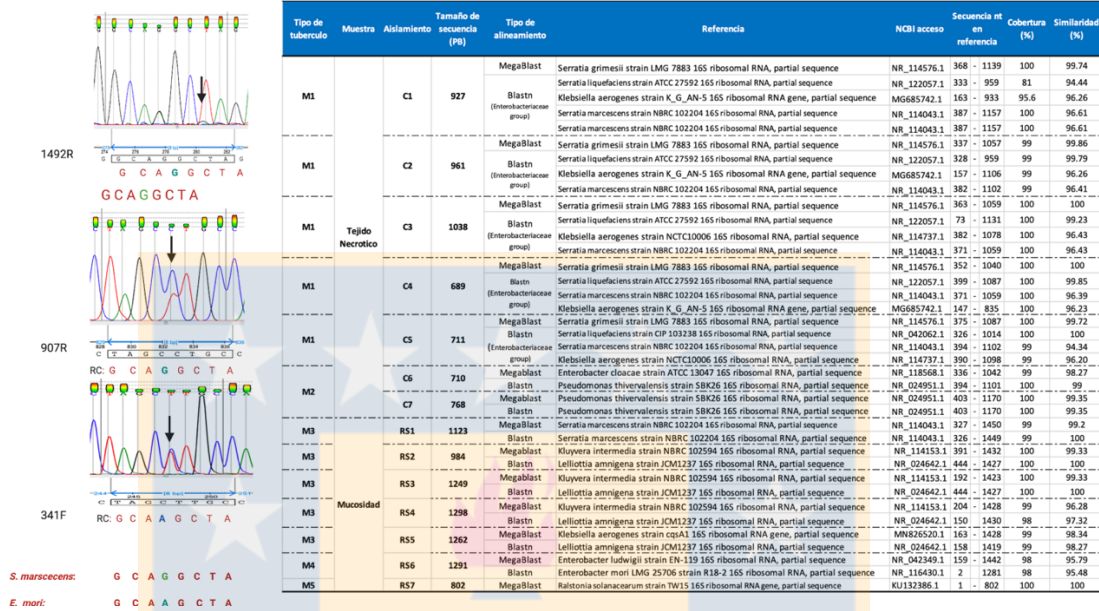


Figura 7. Análisis molecular del gen ADNr 16S de los aislamientos bacterianos. (A) Reconstrucción de una secuencia robusta y más extensa mediante el análisis de los cromatogramas y alineamiento múltiple de las amplificaciones realizadas con dos pares de partidores universales. (B) Alineamiento de secuencias con la base de datos de nucleótidos no redundantes en NCBI con la función megablast en línea y blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

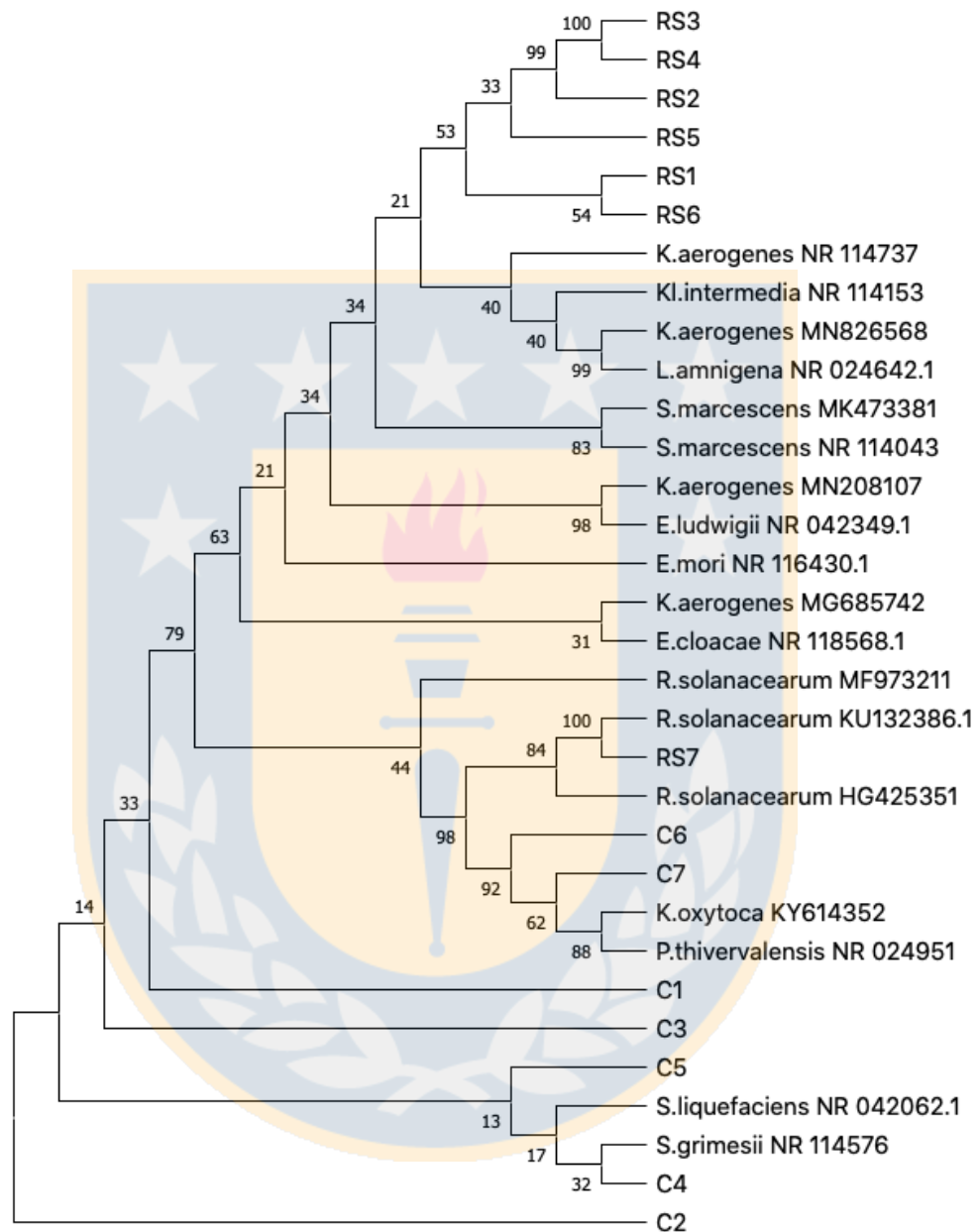


Figura 8. Árbol filogenético basado en el método de reconstrucción filogenética del Vecino Más Cercano que muestra la posición de las muestras bacterianas C y RS comparadas con secuencias parciales de cepas de Enterobacterias, Ralstonia, y Pseudomonas.


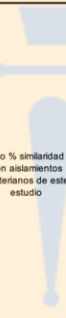
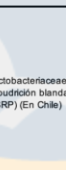

Objetivo específico 2: Implementar una aproximación bioinformática para establecer nuevos marcadores moleculares específicos en base a todas las copias del gen ADNr 16S para la identificación de *Ralstonia solanacearum*.

7.3. Genómica comparativa de secuencias completas del gen ADNr 16S y determinación filogenética de los aislamientos bacterianos

Se descargaron 12 genomas de especies de interés encontradas en el punto 12.6, los cuales contienen desde 2 a 8 copias del gen ADNr 16S, junto con 12 genomas de especies del complejo RSSC con 3 copias del gen ADNr 16S, 4 genomas de patógenos de papa con 7 copias del gen ADNr 16S, y 2 genomas de especies identificadas como responsables de enfermedad marchitez bacteriana en otros hospederos que contienen 6 y 7 copias del gen ADNr 16S (Tabla 1).

El gen ADNr 16S de las especies del complejo RSSC presentó variabilidad a nivel intra-especies entre los filotipos, y las cepas de cada filotipo también presentaron variabilidad. Las cepas de los filotipos II, III y IV presentaron copias idénticas del gen ADNr 16S. Sin embargo, el filotipo I presentó substituciones entre sus 3 copias (Figura 9).

Tabla 1. Información taxonómica y origen de las especies/cepas utilizadas en los análisis de identidad bacteriana.

FILO	CLASE	ORDEN	FAMILIA	GENERO	CARACTERISTICA	ESPECIE	CEPA ID	Nº ACCESO	ANOTACIÓN EN GENE BANK	NIVEL ANOTACION DEL GENOMA	ORIGEN DEL HOSPEDERO	ORIGEN GEOGRAFICO	Nº DE COPIAS 16S rRNA							
Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Ralstonia	RSSC		UY031 (flotipo IIB, sequevar 1)	ASM129955v1	NZ_CP012687	Complete	<i>Solanum tuberosum</i> (Papa)	Uruguay	3							
							Po82 (flotipo IIB)	ASM21532v1	NC_017574	Complete	<i>Solanum tuberosum</i> (Papa)	Mexico	3							
							IBSBF1503 (flotipo IIB)	ASM158715v1	CP012943	Complete	<i>Solanum tuberosum</i> (Papa)	Perú	3							
							K60-1 (phylo type IIA, sequevar 7)	ASM28581v1	NZ_NCTK0100001	Incomplete	<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate)	USA	3							
							GM1000 (flotipo I, sequevar 18)	ASM912v1	NC_003295	Complete	<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate)	Guayana Francesa	3							
							CQPS-1 (flotipo I, sequevar 17)	ASM222046v1	NZ_CP016914	Complete	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tobaco)	China	3							
							CMR15 (flotipo III, sequevar 29)	ASM42719v1	FP885895	Complete	<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate)	Cameroon	3							
							PSI07 (flotipo IV, sequevar 10)	ASM28347v1	NC_014311	Complete	<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate)	Indonesia	3							
							RS 476	ASM59530v1	CP021762	Complete	<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate)	Brazil	3							
							CRMrs218	ASM361297v1	NZ_CP021764.2	Complete	<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate)	Hawaii	3							
							R24	ASM1873395v1	CP076120	Complete	<i>Solanum muricatum</i> (Pepino Dulce)	China	3							
							LLRS-1	ASM1824321v1	CP046729	Complete	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tobaco)	China	3							
							Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Serratia	Serratia	Alto % similitud con aislamientos bacterianos de este estudio		<i>Serratia marcescens</i>	JW-C22	ASM1336773v1	CP055161	complete	Rizofera de planta del Té	China	7
													N4-5	ASM335513v1	CP031316	Complete	Suelo	USA	7	
		<i>Serratia grimesii</i>	BXF1	-	NZ_LT883155	complete							<i>Pinus pinaster</i> trees	Portugal	2					
		<i>Serratia liquefaciens</i>	S1	ASM836432v2	CP048784.1	complete							Mix de ensaladas	Alemania	7					
		<i>Klebsiella aerogenes</i>	G3_AM	ASM1774277v1	CP072327	Incomplete							Suelo Agrícola	India	8					
		<i>Lelliottia amnisena</i>	FDAARGOS_395	ASM239340v1	CP023529	Complete							Suelo	-	7					
		<i>Enterobacter cloacae</i>	CZ-1	ASM419371v1	CP035738	Complete							Suelo	China	8					
		<i>Klebsiella oxytoca</i>	P620	ASM670738v1	CP046115	Complete							Suelo	China	8					
		<i>Kluyvera intermedia</i>	NZ-1	ASM64991v1	CP045845.1	complete							Flores	China	8					
		<i>Enterobacter mori</i>	CX01	ASM1920394v1	CP055276	Complete							<i>Actinidia deliciosa</i> (Kiw)	China	8					
		<i>Enterobacter ludwigii</i>	UW5	ASM102964v1	CP011798	Complete							Suelo	Canada	8					
<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	BS3779	IMG-taxon 2639762509 annotated assembly	LT629691.1	complete	<i>Brassica napus</i> (Canola)	Francia							5							
Enterobacteriales	Pectobacteriaceae	Pectobacterium	Pectobacterium	Pectobacteriaceae de pudrición blanda (SRP) (En Chile)		<i>Pectobacterium atrosepticum</i>							SCR11043	ASM1160v1	NC_004547.2	Complete	<i>Solanum tuberosum</i> (Papa)	Escocia	7	
						<i>Pectobacterium carotovorum</i>							XP-13	ASM1686499v1	CP063242.1	Complete	<i>Solanum tuberosum</i> (Papa)	China	7	
						<i>Dickeya solani</i>	FB0223	ASM371833v1	CP024710.1	Complete	<i>Solanum tuberosum</i> (Papa)	Alemania	7							
						<i>Dickeya dadantii</i>	M2-3	ASM2004715v1	CP077422.1	Complete	<i>Solanum tuberosum</i> (Papa)	China	7							
Enterobacteriales	Erwiniaceae	Erwinia	Pantoea	Otras bacterias responsables de marchitez bacteriana		<i>Erwinia tracheiphila</i>	MDcuke	-	CP013970.1	Incomplete	<i>Cucumis sativus</i> (Pepino)	USA	6							
						<i>Pantoea stewartii</i>	ZJ-FGZX1	ASM1104447v1	CP049115.1	complete	<i>Saccharum officinarum</i> (Caña de Azúcar)	China	7							

Phylotype	Cepa	159	161	203	263	331	354	452	453	454	468	643	663	685	731	1170	1172	1173	1175	1416	1420	1443	1448	1464
IIB	Rsolanacearum_UV031_copy1	C	A	C	C	G	G	T	T	C	A	A	A	G	T	G	A	G	T	T	G	C	G	C
	Rsolanacearum_UV031_copy2	C	A	C	C	G	G	T	T	C	A	A	A	G	T	G	A	G	T	T	G	C	G	C
	Rsolanacearum_UV031_copy3	C	A	C	C	G	G	T	T	C	A	A	A	G	T	G	A	G	T	T	G	C	G	C
	Rsolanacearum_Po82_copy1	C	A	C	C	G	G	T	T	C	G	A	A	G	T	G	A	G	T	T	G	C	G	C
	Rsolanacearum_Po82_copy2	C	A	C	C	G	G	T	T	C	G	A	A	G	T	G	A	G	T	T	G	C	G	C
	Rsolanacearum_Po82_copy3	C	A	C	C	G	G	T	T	C	G	A	A	G	T	G	A	G	T	T	G	C	G	C
	Rsolanacearum_IBSBF1503a_copy1	C	A	C	C	G	G	T	T	C	G	A	A	G	T	G	A	G	T	T	G	C	G	C
	Rsolanacearum_IBSBF1503a_copy2	C	A	C	C	G	G	T	T	C	G	A	A	G	T	G	A	G	T	T	G	C	G	C
	Rsolanacearum_IBSBF1503a_copy3	C	A	C	C	G	G	T	T	C	G	A	A	G	T	G	A	G	T	T	G	C	G	C
IIA	Rsolanacearum_K60_copy1	C	G	C	T	G	G	T	T	C	A	G	A	G	T	G	A	G	T	T	G	T	G	C
	Rsolanacearum_K60_copy2	C	G	C	T	G	G	T	T	C	A	G	A	G	T	G	A	G	T	T	G	T	G	C
	Rsolanacearum_K60_copy3	C	G	C	T	G	G	T	T	C	A	G	A	G	T	G	A	G	T	T	G	T	G	C
I	Rsolanacearum_GMI1000_copy1	C	A	C	C	G	G	A	C	T	T	G	A	G	T	G	A	G	T	C	A	C	A	T
	Rsolanacearum_GMI1000_copy2	C	A	C	C	G	G	A	C	T	T	G	A	G	T	G	A	G	T	C	A	C	A	T
	Rsolanacearum_GMI1000_copy3	C	A	C	C	G	G	A	C	T	T	G	A	G	T	G	A	G	T	C	A	C	A	T
	Rsolanacearum_CQPS-1_copy1	C	A	C	C	G	G	A	C	T	T	G	A	G	T	G	A	G	T	C	A	C	A	T
	Rsolanacearum_CQPS-1_copy2	C	A	C	C	G	G	A	C	T	T	G	A	G	T	G	A	G	T	C	A	C	A	T
	Rsolanacearum_CQPS-1_copy3	C	A	C	C	G	G	A	C	T	T	G	A	G	T	G	A	G	T	C	A	C	A	T
	Rsolanacearum_CMR15_copy1	T	A	T	C	G	G	T	C	T	A	G	G	G	C	G	A	G	T	T	G	T	G	C
	Rsolanacearum_CMR15_copy2	T	A	T	C	T	G	T	C	T	A	G	G	A	C	G	A	G	T	T	G	T	G	C
	Rsolanacearum_CMR15_copy3	T	A	T	C	G	T	T	C	T	A	G	G	G	C	C	T	T	T	T	G	T	G	C
	Rsolanacearum_PSI07_copy1	C	G	C	C	G	G	T	T	C	A	G	G	C	G	A	G	T	C	A	C	A	A	T
Rsolanacearum_PSI07_copy2	C	G	C	C	G	G	T	T	C	A	G	G	C	G	A	G	T	C	A	C	A	A	T	
Rsolanacearum_PSI07_copy3	C	G	C	C	G	G	T	T	C	A	G	G	C	G	A	G	T	C	A	C	A	A	T	
R. pseudosolanacearum	Rpseudosolanacearum_RS476_copy1	C	A	C	C	G	G	A	C	T	T	G	A	G	T	G	A	G	T	C	A	C	A	T
	Rpseudosolanacearum_RS476_copy2	C	A	C	C	G	G	A	C	T	T	G	A	G	T	G	A	G	T	C	A	C	A	T
	Rpseudosolanacearum_RS476_copy3	C	A	C	C	G	G	A	C	T	T	G	A	G	T	G	A	G	T	C	A	C	A	T
	Rpseudosolanacearum_CRMRs218_copy1	C	A	C	T	G	G	T	T	C	A	A	A	G	T	G	A	G	T	T	G	T	G	C
	Rpseudosolanacearum_CRMRs218_copy2	C	A	C	T	G	G	T	T	C	A	A	A	G	T	G	A	G	T	T	G	T	G	C
	Rpseudosolanacearum_CRMRs218_copy3	C	A	C	T	G	G	T	T	C	A	A	A	G	T	G	A	G	T	T	G	T	G	C
R. syzygii	Rsyzygii_RS24_copy1	C	A	C	C	G	G	A	C	T	T	G	A	G	T	G	A	G	T	C	A	C	A	T
	Rsyzygii_RS24_copy2	C	A	C	C	G	G	A	C	T	T	G	A	G	T	G	A	G	T	C	A	C	A	T
	Rsyzygii_RS24_copy3	C	A	C	C	G	G	A	C	T	T	G	A	G	T	G	A	G	T	C	A	C	A	T
	Rsyzygii_LLRS-1_copy1	C	G	C	C	G	G	T	T	C	A	G	G	G	C	G	A	G	T	C	A	C	A	T
	Rsyzygii_LLRS-1_copy2	C	G	C	C	G	G	T	T	C	A	G	G	G	C	G	A	G	T	C	A	C	A	T
Rsyzygii_LLRS-1_copy3	C	G	C	C	G	G	T	T	C	A	G	G	G	C	G	A	G	T	C	A	C	A	T	

Figura 9. Variabilidad nucleotídica a nivel intra-especies del complejo RSSC.

Para el caso de las especies *Enterobacterias* y *Pseudomonas*, todas las copias del gen ADNr 16S mostraron variabilidad intra-genómica entre sus copias con 4 hasta 27 substituciones en sus secuencias. *Enterobacter mori* presentó la mayor variabilidad entre las copias del gen ADNr 16S con alto número de substituciones a lo largo de la secuencia, y el menor número de substituciones lo presentó *Pseudomona* con 2 substituciones entre sus 5 copias. Se observó que *Kluyvera intermedia* que posee 8 copias idénticas.

El alineamiento múltiple de las copias del gen ADNr 16S de las especies que mostraron una alta similitud en conjunto con las 14 muestras problemas aisladas de este estudio permitió visualizar la variabilidad a nivel inter-especies e intra-especies dentro del gen ADNr 16S, y así, determinar la identidad de los aislamientos lo cual se observó en las agrupaciones generadas en el árbol filogenético (Figura 10). Es así que, de las 14 muestras aisladas en este estudio, la muestra RS7 tuvo un 100% identidad con *Ralstonia solanacearum* UY031, aislada desde tubérculo de papa cuyo origen geográfico es de Uruguay, clasificación confirmada como filotipo IIB, secuevar 1.

Los datos representados en el árbol filogenético (Figura 10) sugieren que las muestras de este estudio se encontraban en 5 grupos distintos: (i) C6-C7 - *Pseudomona thievervalensis*, (ii) RS7 - *R. solanacearum*, (iii) C1-C2-C3-C4-C5 - *Serratia liquefaciens* y (iv) RS1 *Serratia marscecens*. A pesar de que el árbol filogenético nos indica la identidad de los aislamientos, observamos el alineamiento detalladamente, base a base, donde pudimos comprobar los aislamientos que tenían 100% similitud con el gen ADNr 16S de las especies estudiadas, cuyos resultados indican que C1-C5 corresponde a *Serratia liquefaciens*, C6-C7 a *Pseudomona thievervalensis*, RS1 a *Serratia marscecens*, RS2 a *Lelliotia amnigena*, RS3-RS6: co-cultivo de cepas y RS7 a *Ralstonia solanacearum* (Tabla 2).

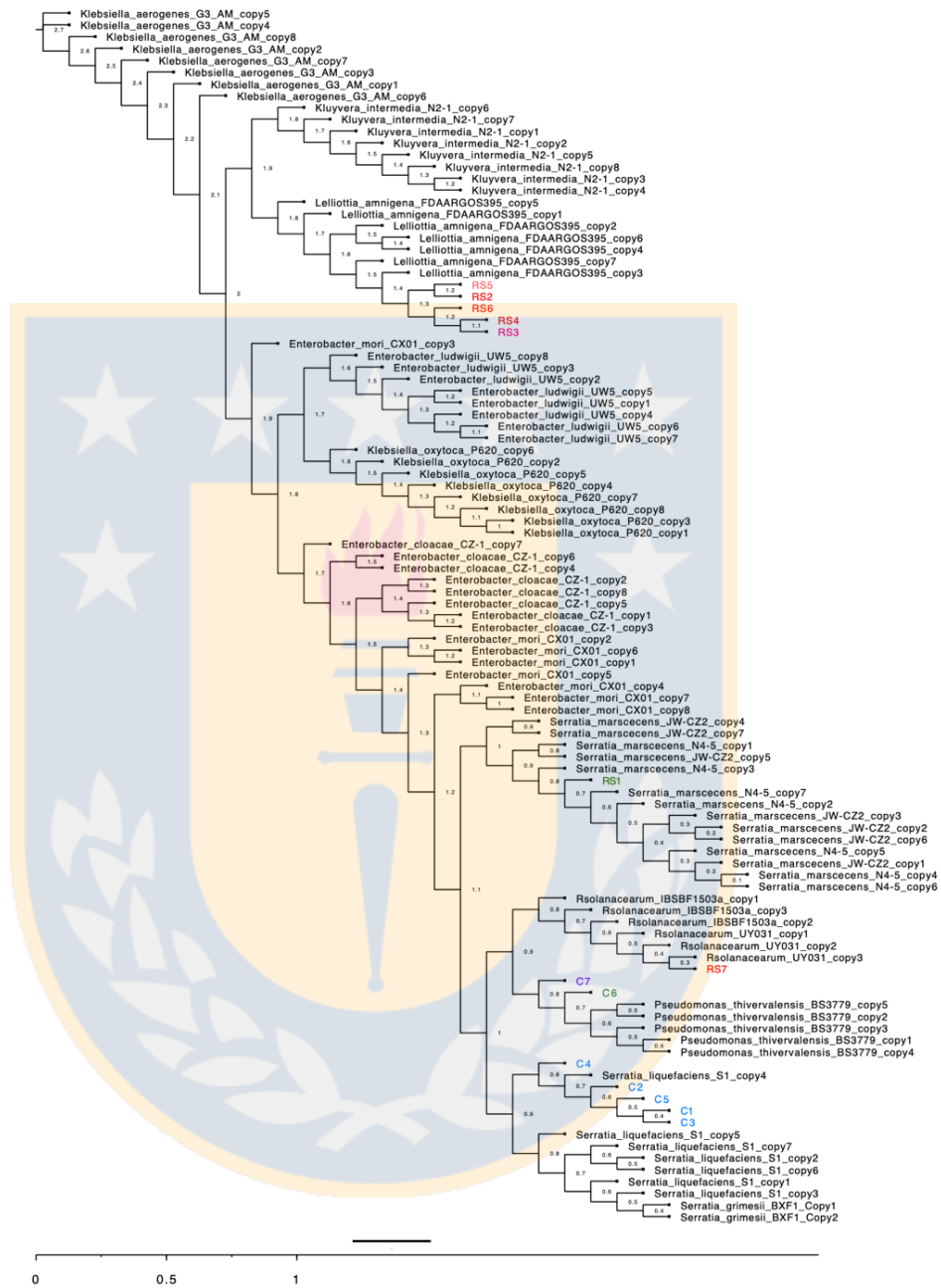


Figura 10. Árbol filogenético basado en el método de reconstrucción filogenética Máxima Verosimilitud de las copias del gen ADNr 16S de las especies: Enterobacteria, Pseudomona, *R. solanacearum*, junto con los productos de PCR reconstruidos de los aislamientos realizados en esta tesis. Los valores de bootstrap obtenidos con 1000 repeticiones se indican como porcentajes en todas las ramas. La barra de escala representa una distancia evolutiva de 0,03. Los números de acceso de GenBank de las diferentes especies se proporcionan en la Tabla 1.

Tabla 2. Porcentaje de similitud basada en la comparación de secuencias parciales del gen ADNr 16S obtenida en los aislamientos y las copias del gen ADNr 16S en diferentes especies de bacterias.

Aislamiento	Alineamiento secuencia parcial (Megablast)		Alineamiento secuencia completa	
	Especie	Similitud (%)	Especie	Similitud (%)
C1	<i>Serratia grimesii</i>	99.74	<i>Serratia liquefaciens</i>	100
C2	<i>Serratia grimesii</i>	99.89	<i>Serratia liquefaciens</i>	100
C3	<i>Serratia grimesii</i>	100	<i>Serratia liquefaciens</i>	100
C4	<i>Serratia grimesii</i>	100	<i>Serratia liquefaciens</i>	100
C5	<i>Serratia grimesii</i>	99.72	<i>Serratia liquefaciens</i>	100
C6	<i>Pseudomonas thiver valensis</i>	98.27	<i>Pseudomonas thiver valensis</i>	100
C7	<i>Pseudomonas thiver valensis</i>	99.35	<i>Pseudomonas thiver valensis</i>	100
RS1	<i>Serratia marcescens</i>	99.2	<i>Serratia marcescens</i>	100
RS2	<i>Kluyvera intermedia</i>	99.33	<i>Lelliottia amnigena</i>	100
RS3	<i>Kluyvera intermedia</i>	99.33	co-cultivos	-
RS4	<i>Kluyvera intermedia</i>	96.28	co-cultivos	-
RS5	<i>Klebsiella aerogenes</i>	98.34	co-cultivos	-
RS6	<i>Enterobacter ludwigii</i>	95.79	co-cultivos	-
RS7	<i>Ralstonia solanacearum</i>	100	<i>Ralstonia solanacearum</i>	100

Además, se analizaron los aislamientos del co-cultivo (RS3-RS6) como se mencionó anteriormente, encontrando que RS3-RS4-RS5 presentan bases nitrogenadas indeterminadas diferentes a *L. amnigena* en las 60 primeras bases de la secuencia parcial, que corresponde a la posición previa a las 420 de *L. amnigena*; sin embargo, posterior a eso, la secuencia es idéntica a *L. amnigena*. Por el contrario, en la muestra RS6 se pueden observar bases nitrogenadas que pertenecen a las especies *Enterobacterias*, *Pseudomona* e inclusive se observan bases nitrogenadas exclusivas de *R. solanacearum* a lo largo de toda la secuencia (Anexo 2). Dada la incertidumbre de su identidad, se realizó un alineamiento con secuencias del gen ADNr 16S de patógenos reportados en papa y con sintomatología similar a la provocada por *R. solanacearum*: *Pectobacterium atrosepticum*, *Dickeya solani*, *Dickeya dadanti*, *Pectobacterium carotovorum*, *Erwinia tracheiphila* y *Pantoea stewartii*; sin embargo, el resultado no permitió asignar una identidad a la muestra (Anexo 3).

Este análisis de secuencias completas que incluían todas las variantes o copias del operón ribosomal 16S evidenció un cambio en la determinación filogenética de los aislamientos con respecto a los resultados que consideran secuencias parciales del gen ADNr 16S (Tabla 2), metodología comúnmente utilizada para determinación de especies. Para determinar que nuestras corresponden a especies, utilizamos un nivel de similitud del 100%, confirmado la identidad de 10 de los 14 aislamientos.

7.4. Diseño de partidores basado en las regiones variables en *R. solanacearum*

El alineamiento múltiple de cepas de *R. solanacearum* con *E. coli* permitió identificar las regiones variables en *R. solanacearum* cepa UY031, cepa identificada con 100% de similitud con la muestra RS7 en el presente estudio. La secuencia de 1532 bases se utilizó para determinar las regiones hipervariables identificadas como de interés. Estas regiones se encontraron dentro de las regiones variables V3, V5, V6 y V7 (Tabla 1). Una región se consideró como hipervariable, siempre y cuando tuviera >4 bases consecutivas que sean exclusivas y de interés para discriminar *R. solanacearum*.

Tabla 1. Regiones hipervariables encontradas para discriminar *Ralstonia solanacearum*.

REGIÓN	POSICIÓN	PB	SECUENCIA DE INTERÉS
V1	70-94	26	-
V2	132- 220	89	-
V3	434-490	57	434-438
V4	583-645	62	-
V5	823-850	28	833-849
V6	993-1032	40	1022-1024
V7	1114-1146	33	1127-1131
V8	1234-1285	52	-
V9	1425-1455	31	-

Dada la extensión del tamaño de la región en la cual se diseñaron los partidores y considerando el límite de confiabilidad de la secuenciación tipo Sanger (<800 pb), se consideró diseñar partidores que amplifique la región interna de la secuencia con el objetivo de lograr secuenciar de manera robusta y sensible la región de interés (Tabla 4).

Tabla 4. Diseño de partidores para el gen ADNr 16s de *R. solanacearum* y sus características.

Nombre	Dirección	Secuencia	%GC	Tm°C	Longitud	Posición
F2-E		5-TAGCTGGTCTGAGAGGACGA-3	55	56,9	20	281-300
F6-I		5-CGTGTAGCAGTCAAATGCGTAG-3	50	56,1	22	676-697
		3-GCACATCGTCACTTTACGCATC-5				
R1-I	Rv-Cm	5-CTACGCATTTCACTGCTACACG-3				697-676
R3-E		5-GGTGAAGTCGTAACAAGGTAGC-3	50	55,4	22	1478-1499
		3- CCACTTCAGCATTGTTCCATCG-5				
	Rv-Cm	5-GCTACCTTGTTACGACTTCACC-3				

Por lo tanto, se amplificaron las siguientes regiones para obtener los tamaños de amplicones indicados a continuación:

F2-E – F6-I (R1-I): 417 pb
 F6-I – R3-E : 824 pb
 F2-E – R3-E : 1219 pb

Posteriormente, se verificó la amplificación obtenida con los partidores diseñados en geles de agarosa 1,2% con las condiciones y programa de PCR (Ver sección 6.8). La amplificación se hizo desde ADN genómico de *R. solanacearum* y además se realizó

una PCR directa desde colonia. Para ambos casos, las amplificaciones correspondían al tamaño de bases esperado según los partidores diseñados (Figura 13).



Figura 13. Gel de agarosa al 1.2% mostrando los productos de PCR obtenidos utilizando 3 combinaciones con 3 partidores que amplifican la región variable en *R. solanacearum*.

7.5. Análisis de la región variable para análisis de *R. solanacearum* en muestras complejas de comunidades bacterianas

Para el análisis metagenómico, se analizaron las bases de datos SILVA en sus versiones 128, 132, y 138. Esto se puede observar en la Figura 15(A) que muestra el alto número de taxones nuevos (115.673) en la versión 138; es decir, 25.775 anotaciones sufrieron cambios en su asignación taxonómica desde la transición de las versiones 132 a la 138. La base de datos 132 presentó un menor número de taxones nuevos (Figura 14A). Sin embargo, la familia *Burkholderiaceae* presenta 11.308 taxones a diferencia de la base de datos 138 con 5.534 taxones. *Esta información determinó el uso de la base de datos 132 para los estudios metagenómicos tanto de las muestras de agua como de suelo analizadas en este estudio.*

En el caso de *Ralstonia* y *Enterobacterias*, se observó una transición dentro del orden Gamma-Proteobacteria y Beta-Proteobacteria, así como también a nivel de familia y género para *Enterobacteriaceae* y *Burkholderiaceae* como se señala en las Figuras 14B-D.

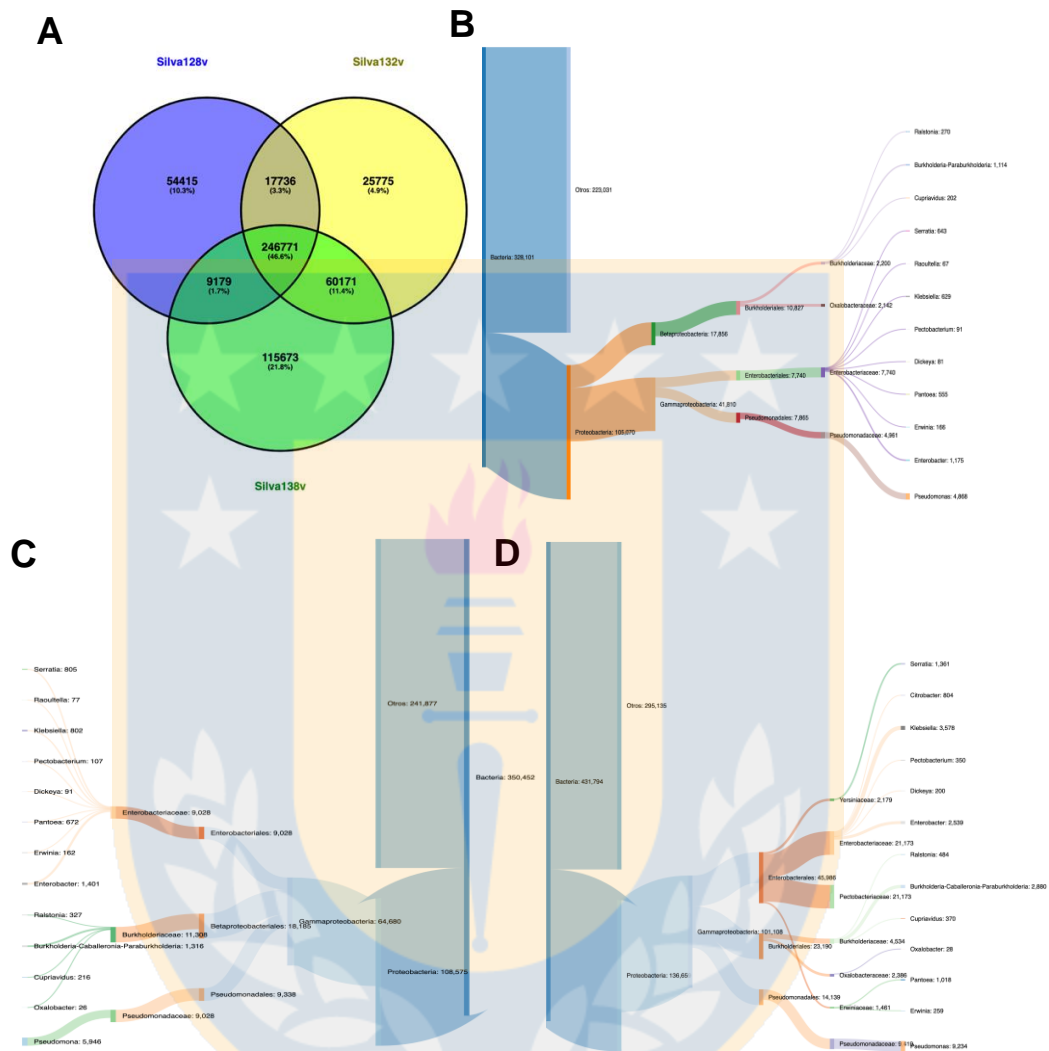
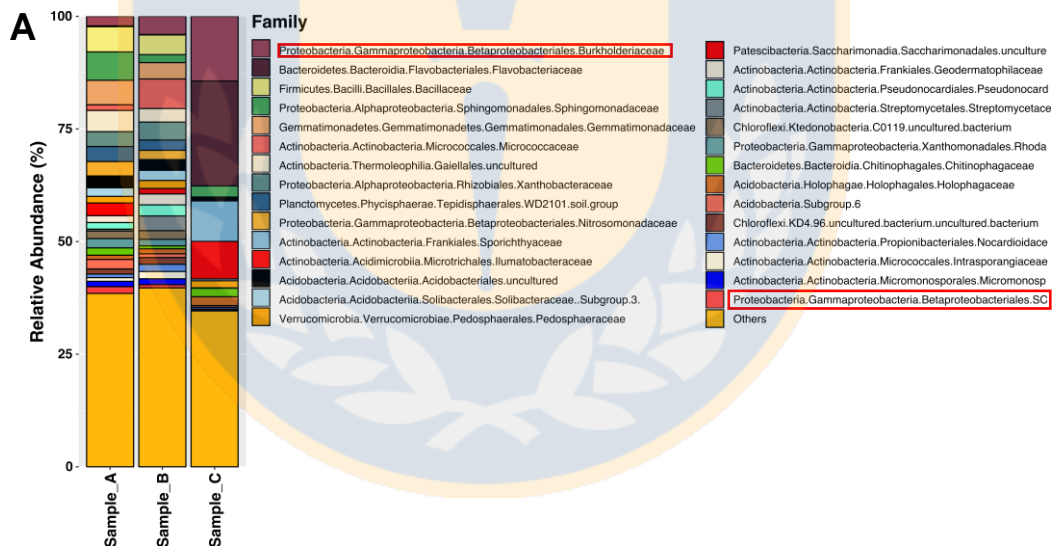


Figura 14. Análisis de las diferentes bases de datos del gen ADNr 16S (SILVA). A. Diagrama de Venn de anotaciones de los taxones en las tres bases de datos SILVA. B. Cambios evolutivos del gen ADNr 16S para algunas especies de las familias *Burkholderia* y *Enterobacterias* según base de datos Silva 128V, C. Cambios evolutivos del gen ADNr 16S para algunas especies de las familias *Burkholderia* y *Enterobacterias* según base de datos Silva 132V y D. Cambios evolutivos del gen ADNr 16S para algunas especies de las familias *Burkholderia* y *Enterobacterias* según base de datos Silva 138V.

Para la secuenciación de las muestras ambientales (agua y suelo) se utilizó la plataforma Illumina MiSeq, y nos enfocamos en la amplificación de la región V3-V4 con partidores universales. Los resultados revelaron el predominio de *Burkholderiaceae* considerablemente mayor en la muestra de agua (Muestra C) que en las de suelo (Muestra A y B). Sin embargo, no se detectó el género *Ralstonia*. Así también se puede observar que los filos *Pseudomonadales* y *Enterobacteriaceae* se encuentran en una abundancia relativa de 1,6 % y 0,06%, respectivamente (Figura 15). En el Anexo 4 se muestran la abundancia absoluta e índices de riqueza y diversidad de cada muestra analizada en este estudio.



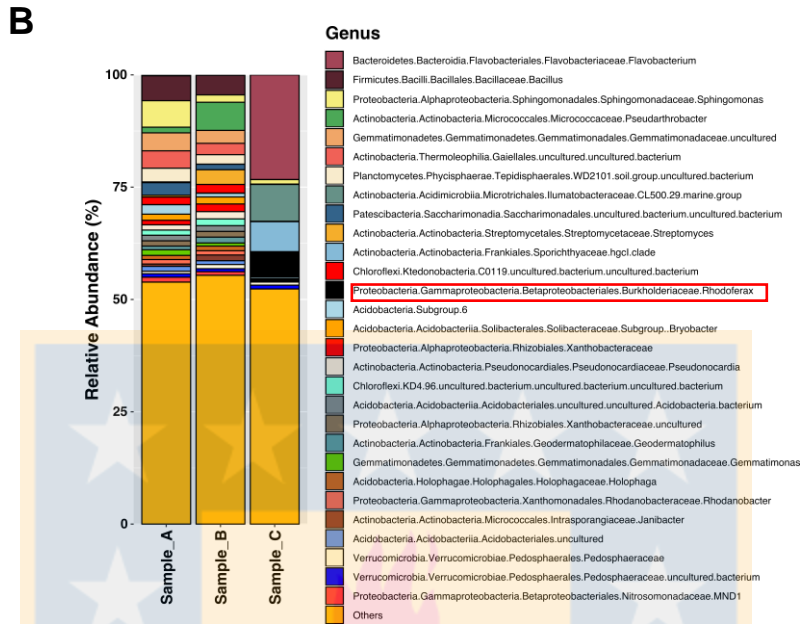


Figura 15. Gráfico de barra mostrando la abundancia relativa de los ASVs de las principales familias (A) y géneros (B) que se encontraron en los análisis metagenómicos de las muestras ambientales de este estudio. Sample A y Sample B corresponden a muestras de suelo y Sample C a una muestra de agua.

Debido a que los análisis metagenómicos no detectaron la especie *R. solanacearum* en las muestras ambientales de suelo y agua, se analizó la región variable V3-V4 del gen ADNr 16S que se utilizó para generar las librerías de secuenciación, específicamente para determinar la variabilidad de esa región en el alineamiento múltiple de secuencias, considerando sólo copias únicas. La región analizada indicó una baja variabilidad entre las cepas utilizadas en este estudio (Figura 16).

8. DISCUSIÓN

Objetivo específico 1: Determinar la sensibilidad de la metodología basada en aislamiento selectivo y en la amplificación de una copia del ADNr 16S para la identificación de *Ralstonia solanacearum axenica*.

Ralstonia solanacearum es un complejo de especies heterogéneas, que ha transitado por varios intentos para encontrar un sistema de clasificación adecuado, establecida hoy en día como un complejo de especies de *Ralstonia solanacearum* (RSSC), recientemente separado en tres genoespecies (*R. solanacearum*, *R. pseudosolanacearum* y *R. syzygii*) (Sharma et al., 2021).

Actualmente, la detección de *R. solanacearum* se basa principalmente en métodos de cultivo, pero esta bacteria puede perder su capacidad de ser cultivada en medios sólidos (estado VBNC) (Scherf et al., 2010; Van Overbeek et al., 2004). En nuestro estudio, las células de *R. solanacearum* almacenadas en agua a -20°C se encontraron en un estado cultivable durante al menos 6 meses, mientras que las que se mantuvieron a -80°C y almacenadas en glicerol se volvieron no cultivables en 1 mes. El estado VBNC se ha demostrado en *R. solanacearum* a bajas temperaturas (Caruso et al., 2005; Van Elsas et al., 2000; Van Overbeek et al., 2004), y la sobrevivencia prolongada en agua ha sido demostrada en agua estéril durante 112 días, pudiendo mantener la capacidad de cultivo (Stevens et al., 2018). La capacidad de sobrevivir se basa en el tránsito a un estado metabólico inactivo reversible de dormancia (Lewis,

2010b; Mori et al., 2018b). Esta característica explica el bajo éxito de los distintos mecanismos de control para erradicar el patógeno (Yuliar et al., 2015). Por lo tanto, este estado influye directamente en el aislamiento y detección del patógeno.

La metodología de cultivo respecto a los medios de aislamiento se basa en la formación de colonias que permitan aislarla de manera selectiva, considerando que, menos del 1% de la microbiota puede aislarse fácilmente, mientras que el 99% restante de los microbios son viables pero no cultivables (VBNC) (X. Liu et al., 2016). En nuestras muestras se puso de manifiesto una discrepancia entre los métodos de cultivo comúnmente utilizados y que contienen antibióticos de la familia de polimixina y fungicidas en mayor concentración, y en menor concentración β -lactámicos y fenólicos (Imazaki & Nakaho, 2009). La polimixina es parte de la lista de antibióticos para las bacterias Gram negativas multirresistentes, como las Enterobacterias (Chew et al., 2017). Sin embargo, El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) actualmente no tiene puntos de corte de polimixina B para *Enterobacteriaceae*, pero ha publicado valores de corte epidemiológicos de otro antibiótico de la familia de polimixinas colistina para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Raoultella ornithinolytica*, *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae* (Chew et al., 2017).

La polimixina B es bactericida contra un gran número de bacilos Gram-negativos; pese a que algunas especies de *Pseudomona*, *Proteus*, *Serratia* y *Burkholderia* pueden ser resistentes (Olaitan et al., 2014). Algunas de estas bacterias que muestran resistencia a polimixina, presentan características fenotípicas de sus colonias similares a *Ralstonia* en los medios de aislamiento TZC (Kumar et al., 2017; Sarkar & Chaudhuri, 2015). En nuestro estudio, las características fenotípicas de los aislamientos fueron

consistentes con los resultados de Kumar et al. (2017), quienes mostraron colonias virulentas después de 36-48 horas de color blanco o crema, de forma irregular, altamente fluidas y opacas, quienes comprobaron que sus aislamientos pertenecían a *Enterobacterias* y *Ralstonia*.

Por otro lado, las pruebas bioquímicas mostraron resultados diferentes para todas los aislamientos, semejante a lo reportado en estudios de identificación de cepas de *R. solanacearum* realizados por Hayward (Hayward, 1964b, 1991b), sugiriendo que las cepas aisladas podrían corresponder a tres cepas distintas, y de acuerdo a la caracterización de biovars podrían pertenecer a los perfiles de biovar 2, 3 y 4, los que han sido reportados como responsables de la pudrición parda en papa (Ahmed et al., 2013; Elphinstone et al., 1996; Kheirandish & Harighi, 2015).

A pesar de este resultado, no necesariamente las cepas pertenecientes al complejo RSSC poseen este comportamiento, sino que son métodos habituales para la identificación de *Serratiae* y otras *Enterobacteriaceae* (Brisse et al., 2006) que permiten, por ejemplo, identificar 18 biotipos del género *Serratia* (Grimont & Grimont, 2006). Como esta caracterización es ampliamente utilizada, y se ha considerado que la cepa responsable de la infección de papa corresponde a Raza 3 biovar 2, se ha visto también que la papa ha sido infectada por las cepas de amplio rango de huéspedes de *R. solanacearum* en la raza 1 (Buddenhagen et al., 1962; Hayward, 1964b), así como también biovar 3 y 4 en aislamientos desde papa en China (He, 1983). Por lo tanto, no existiría una relación directa entre raza y biovar, sugiriendo que la continuidad de su uso podría ser un problema en la clasificación de las cepas de *R. solanacearum*.

Continuando con la metodología tradicional para detección de *R. solanacearum*, la secuenciación de los 14 aislamientos no mostró aislamientos axénicos de *R. solanacearum*, sino que sólo RS7 fue identificada como colonia pura y el resto de los aislamientos correspondía a una mezcla de bacterias con una alta similitud >98% con *Enterobacterias* y *Pseudomona*. Estos resultados fueron similares a los encontrados en el aislamiento de *Ralstonia solanacearum* desde solanáceas que reportaron sintomatología de marchitez bacteriana, amplificando el gen ADNr 16S y comparado con la base de datos NCBI, donde fue reportado entre un 97%-99% de identidad con el grupo *Enterobacteriaceae* (Sarkar & Chaudhuri, 2015). En otro estudio, el aislamiento y determinación de *R. solanacearum* en caléndula (*Tagetes erecta L*) cuyas características morfológicas y microscópicas indicaban ser dicho patógeno, la secuenciación parcial del gen ADNr 16S (secuencia de 1273 pb), demostró claramente que el patógeno pertenece al género *Enterobacter*, específicamente *E. cloacae* y no *Ralstonia* (Jeevan et al., 2021). Respecto al ciclo de vida de *E. cloacae*, al igual que *R. solanacearum*, prospera en un ambiente comparativamente pobre en nutrientes y alto flujo en el xilema de sus hospederos, alterando el flujo del agua que conlleva a la decoloración vascular, el bloqueo y la mortalidad de las plantas (Tsuda et al., 2001). Es así como se ha asociado *E. cloacae* en marchitez de tomate (Sarkar & Chaudhuri, 2015), jengibre (J. Liu et al., 2020) y pimiento picante (García-González et al., 2018) en India, Malasia y México, respectivamente.

Otro caso es el reporte de la enfermedad de marchitez bacteriana en mora (*Mulberry*), por *Enterobacter* spp denominada como *Enterobacter mori* y *Enterobacter asburiae* (Tsuda et al., 2001), hospedero que se ha relacionado con *R. solanacearum* como responsable de la marchitez (Wang et al., 2008). Esta imprecisión de la

determinación es más confusa aún cuando el comportamiento y síntomas que provocan las bacterias en los hospederos son muy similares a *R. solanacearum*, como se observó en el caso de *E. cloacae*.

Estos estudios nos permitieron discutir si el análisis de homología y similitud de las cepas en los estudios han logrado su correcta identificación, y de lo contrario, podrían estar realizando un diagnóstico errado de la enfermedad producida por *R. solanacearum*. Por lo tanto, consideramos que las caracterizaciones morfológicas, bioquímica y de secuenciación del gen ADNr 16S por sí solos no pueden afirmar que el organismo causal de la marchitez bacteriana sea *R. solanacearum*. Esta información es relevante al momento su caracterización molecular, dado que tradicionalmente el análisis de la secuencia del gen ADNr 16S no toma en consideración múltiples copias del gen (Pei et al., 2010; Větrovský & Baldrian, 2013) y se utiliza el consenso o una sola secuencia representativa, ignorando las diferencias entre las copias que existen entre el gen ADNr 16S, provocando así análisis y conclusiones erróneas. Como alternativa y complemento, además del uso del gen ADNr 16S, se ha sugerido la secuenciación de otros genes variables y de copia única como *rpoB* (Tayeb et al., 2008), *gapA*, *gyrB*, *dnaA* y genes del mega-plásmido: *hrpBy* y *egl* (Paudel et al., 2020) para la caracterización taxonómica del complejo RSSC.

Objetivo específico 2: Implementar una aproximación bioinformática para establecer nuevos marcadores moleculares específicos en base a todas las copias del gen ADNr 16S para la identificación de *Ralstonia solanacearum*.

Nuestra propuesta metodológica basada en el uso del análisis del gen ADNr 16S completo y todas sus copias tanto del complejo RSSC, en conjunto con todas las especies que han mostrado una alta similitud con los aislamientos de esta tesis, permitió aumentar la precisión del análisis como método de referencia para la identificación bacteriana, sobre todo considerando que el filo (Proteobacteria) al cual pertenece *Ralstonia* y *Enterobacterias*, pueden tener hasta 15 copias de operones del ADNr 16S (Pei et al., 2010). A diferencia de los resultados analizados con secuencias parciales y copia única que determinó tres cepas con una identidad del 100%, la estrategia propuesta en este estudio permitió identificar la identidad de 10 cepas/aislamientos (100% similitud) la cual sólo *R. solanacearum* fue consistente en ambos análisis. Las cepas encontradas pertenecían a *Enterobacterias* (*Serratia liquefaciens*, *Serratia marscecens* y *Lleliotia amnigena*) y *Pseudomonas* (*Pseudomonas_thivervalensis*).

A diferencia de estudios similares (Sarkar & Chaudhuri, 2015), además de *Enterobacterias*, se logró aislar *Pseudomona thivervalensis* la cual es una bacteria saprofita que se ha encontrado en los aislamientos de bacterias en papa en Brasil (Nascimento et al., 2019). Especies del género *Pseudomona* se han descrito como una rizobacteria antagónica del suelo rizosférico, especialmente en la zona del suelo rizosférico de tomate, ají, berenjena y otros cultivos de *solanáceas* (Tan et al., 2013). Por otra parte, ya se ha demostrado la capacidad antagónica de *Enterobacterias*

(*Enterobacter hormaechei* cepa SRU4.4 y *Serratia marcescens* cepa SGT5.3), como antagonistas potenciales de *R. solanacearum* (Mamphogoro et al., 2021). Por lo tanto, la presencia de estas bacterias, reducirían la capacidad de encontrar *R. solanacearum* en aislamientos de muestras ambientales.

Por otro lado, 4 de las 14 cepas fueron aislamientos en co-cultivo (RS3-RS6), las que pertenecían al aislamiento realizado directamente desde la mucosidad, misma estrategia utilizada en el aislamiento axénico de *R. solanacearum*, pero de un tubérculo diferente. Una de las razones que podría explicar la escasa sensibilidad y contaminación de los resultados, se basa en los límites de detección de la PCR que dependen del tipo de protocolo y la naturaleza de la muestra utilizada. Se ha descrito que a partir de extractos de papa, el límite de detección de la técnica PCR oscila entre 10^1 - 10^2 UFC/ml (Ahmed et al., 2013). Además, la cantidad de ADN utilizado en la reacción de PCR es un factor importante, sobre todo cuando el número de copias de *R. solanacearum* es menor que las saprófitas encontradas en el estudio. Otra limitación de esta técnica radica en la especificidad de los partidores, sólo menos del 40% de las secuencias del gen ADNr 16S de tipo bacteriano coinciden completamente con los partidores 27F y 1492R (Fukuda et al., 2016).

Por lo tanto, el uso de estos partidores podría determinar que *R. solanacearum* no es el principal patógeno causante de marchitez, sino que también podrían estar involucrados miembros de *Enterobacteriaceae* y otros saprofitos.

Con respecto a la variabilidad dentro del complejo RSSC, se logró identificar variaciones intra-especies, pero que fueron consistentes con las diferencias que las permiten agrupar en filotipos distintos. Es importante señalar que la región V3-V4 (posición 343-645) es una región conservada dentro del complejo RSSC. Para esta región ya se han propuesto el uso de partidores específicos OII1 y Y2 que son comúnmente utilizados, pero no son lo suficientemente específico, ya que híbrida con *R. syzygii*, *Xanthomonas arboricola pv. celebensis* y se ha obtenido señal en cromatograma con bacterias saprófitas presentes en los tubérculos de papa (Seal et al., 1999). El grupo de Seal y colaboradores (1999) han incluido este set de partidores dentro de una PCR multiplex para amplificar las siguientes posiciones del gen ADNr 16S: 74–97, 455–475, y 1454–1474 (Seal et al., 1999). No obstante, según nuestros resultados, frente a la posible contaminación con otras bacterias saprófitas, estas regiones conservadas enterobacterias y pseudomona sesgaría los resultados.

A pesar de esto, la secuenciación del gen ADNr 16S sigue siendo la estrategia más utilizada para estudios de filogenia y taxonomía, y nuestro trabajo propone su uso con partidores específicos dirigidos a amplificar la región V3-V7 (712 pb) con énfasis en la región V5-V7 (323 pb), región que presentó sustituciones únicas en *R. solanacearum*. La utilización de los partidores específicos diseñados en esta tesis permitiría diferenciar la presencia de un aislamiento puro de *R. solanacearum*, o la presencia de contaminantes saprófitos.

El uso de estos partidores específicos, no solo se propone para la determinación filogenética de *R. solanacearum* como cepa pura, sino que también se propone para amplificar dichas regiones y verificar la presencia del patógeno en la comunidad que la compone tanto en el ambiente como en el hospedero.

En el presente estudio, exploramos las muestras de suelo del predio de Linares y el agua de riego que se utilizaba en la plantación de papa. La infección por marchitez en el predio resultó en una pérdida de rendimiento del 100% para el agricultor.

Para realizar la identificación taxonómica de las comunidades bacterianas con el objetivo de encontrar *R. solanacearum* en el ambiente, se utilizó la base de SILVA versión 132, posterior a revisar la información de las tres últimas versiones de esta base de datos.

La base de datos Silva versión 128, así como también las que le preceden, se basan en los esquemas taxonómicos de Bergey (Quast et al., 2013). Si bien es el marco taxonómico ampliamente aceptado para bacteria y archaea, estos esquemas no se actualizan con la suficiente regularidad que permitan incluir la descripción de nuevos taxones (Glöckner et al., 2017). En cambio, las dos últimas bases de datos Silva, que corresponden a la versión 132 y versión 138, poseen información actualizada en base al trabajo cooperativo y alineado con la base de datos de taxonomía del genoma (GTDB; por sus siglas en inglés) (DataBase Silva 2022; <https://www.arb-silva.de/documentation/silva-taxonomy/>). A su vez, la base de datos GTDB proporciona una taxonomía basada en los genomas procariontes procedente de la base de datos NCBI (Parks et al., 2022). Esta actualización implicó una transición respecto al equipo

de curadores taxonómicos (Parks et al., 2022) que provocaron cambios en la nomenclatura, especialmente en los rangos más altos (por ejemplo, a nivel de filo y de clase) (Sanford et al., 2021). Esto permitió que, la última versión138 superara considerablemente el número de taxones nuevos respecto a la versión132. Sin embargo, estos nuevos taxones corresponden a secuencias de organismos no cultivados, o de organismos que pueden mantenerse en el laboratorio, pero para los cuales no se dispone de cultivos axénicos (Parks et al., 2022; Sanford et al., 2021), lo que deriva a la creación de nuevos nombres de género antes de ser documentados en literatura (Waite et al., 2020.).

Por lo tanto, la metodología del análisis metagenómico fueron hechos utilizando la base de datos silva versión 132, cuyos resultados indicaron que los taxones dominantes presentes en el suelo y agua, fueron concordantes con la dominancia del microbioma de huésped con síntomas de marchitez bacteriana, las cuales han sido caracterizadas para bacterias pertenecientes a los filos *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria* y *Actinobacteria* en la rizosfera de la planta de tomate (Wen et al., 2020) y plantaciones de tabaco (X. Liu et al., 2016).

En nuestro estudio, tanto en suelo como en agua, no se logró determinar la presencia del género *Ralstonia*, pero si la familia *Burkholderareace*, y en una mayor abundancia, en agua (Figura 15). La mayor abundancia encontrada en el agua que en el suelo, se puede deber a que, a pesar que en suelo existe una mayor abundancia relativa y diversidad taxonómica, las condiciones adversas al que está expuesto el suelo logran ejercer efectos en los componentes taxonómicos y funcionales de las comunidades del microbioma (Deng et al., 2021).

En base a los resultados que pusieron en evidencia la alta similitud de la región V3-V4 entre bacterias saprófitas y *R. solanacearum*, su uso en estudios de metagenómica no podría igualar la precisión taxonómica lograda al secuenciar el gen ADNr 16S completo. Sin embargo, la secuenciación metagenómica convencional se lleva a cabo mediante la secuenciación de secuencias cortas, por medio de secuenciadores de segunda generación, por ejemplo, MiSeq de Illumina, que permiten la secuenciación de amplicones de hasta 300 pb con alta precisión (Caporaso et al., 2012). Esta longitud permite considerar de una a tres regiones variables adyacentes del gen ADNr 16S utilizando partidores "universales" para las regiones conservadas (Abellan-Schneyder et al., 2021). A pesar de ellos, la elección de las regiones variables y la longitud de la secuencia del gen ADNr 16S influirán en el perfil microbiano de manera diferente según el rango taxonómico y el grupo filogenético (Klemetsen et al., 2019).

Por el contrario, la secuenciación del gen ADNr 16S en su longitud completa es posible mediante el uso de secuenciadores de tercera generación, por ejemplo, Oxford Nanopore Technologies (ONT) (Branton et al., 2008) y Pacific Biosciences (PB) (Eid et al., 2009). La mayor ventaja es la larga longitud de las lecturas (hasta 10.000 pb) y secuenciación a nivel de una sola molécula en poco tiempo. Estas largas lecturas permiten una mejor identificación de taxones bacterianos, como se muestra en varios estudios recientes (Johnson et al., 2019; Kai et al., 2019; Peterson et al., 2021; Van Goethem et al., 2021; Wang et al., 2008). El secuenciador MinION de ONT tiene una menor precisión de lectura, pero puede generar longitudes de lectura mucho más largas que las del Illumina MiSeq (Abellan-Schneyder et al., 2021). Nygaard et al.(2020)

analizaron los microbiomas del polvo de construcción usando ONT MinION e Illumina MiSeq, y demostraron que, a nivel de género y especie, los datos provenientes del secuenciador ONT MinION permitió una mayor resolución taxonómica que los datos generados en un Illumina MiSeq (Nygaard et al., 2020).

Estas alternativas de metodologías de secuenciación permitirían resolver las desventajas que implica la elección de regiones de secuencia parcial.

Nuestros resultados demostraron que, amplificando la región más utilizada para estudios de metagenómica, ésta no permite representar con exactitud la abundancia absoluta de las diferentes especies. Las secuencias parciales pueden afectar significativamente los resultados debido a las divergencias que existen en las diferentes regiones del gen 16S rRNA (Yang et al., 2016). Además, la amplificación depende de la elección de los partidores, que pueden tener un efecto significativo en la proporción de las abundancias. Por esa razón se sugiere diseñar y evaluar partidores alternativos para preguntas de investigación específicas (Hallmaier-Wacker et al., 2019). Recientes estudios *in silico* mostraron que las regiones V4-V6 son las más confiables para el estudio filogenético de nuevos filos (Yang et al., 2016) y las regiones V4, V5-V6 y V6-V7 son las regiones más adecuadas para fines metagenómicos, porque proporciona estimaciones comparables a las obtenidas con la secuencia completa del gen 16S rRNA (Youssef et al., 2009). Por lo tanto, nuestros resultados confirman lo sugerido en estos estudios.

9. CONCLUSIONES

En este trabajo se expuso la importancia de *Ralstonia solanacearum* como un patógeno cuarentenario a nivel mundial que debe ser controlado; y para ello, el correcto diagnóstico de la enfermedad debe ser reevaluado desde su aislamiento. Dentro de este contexto, se presentó una estrategia metodológica de alta sensibilidad para su determinación, que exige identificar la especie con un 100% de identidad con sus referencias. Esto condujo a la selección de regiones hipervariables del gen 16S DNAr de *R. solanacearum* que permiten diferenciar a la especie con saprofitos contaminantes. Sin embargo, esta región no coincide exactamente con la región hipervariable utilizada de manera universal para discriminar taxones a nivel de población (región V3-V4); sino todo lo contrario, mostró ser relativamente conservada en *R. solanacearum* y saprofitos incluidos en este estudio.

Los resultados sugieren que la región V3 a V7 presenta mayor idoneidad para discriminar entre *Ralstonia solanacearum* y otras especies de la misma orden, como *Enterobacterias* y *Pseudomonas*, que no logran ser aisladas mediante la estrategia de cultivo semi-selectivo convencional. Adicionalmente, se determinó que la región V5-V7 como la región hipervariable de *R. solanaearum*. La amplificación de sólo esta región podría ser utilizada en análisis metagenómicos, herramienta útil para la detección del patógeno en el ambiente.

Esta diferenciación y determinación rápida del agente cuarentenario en una sola reacción, con partidores específicos dirigidos a amplificar las regiones hipervariables, no solo es rentable para el diagnóstico, sino una herramienta de detección rápida que pueda ser ampliamente útil para identificar y rastrear cepas RSSC en estudios epidemiológicos, así como también en suelo y agua, evitando la amplificación cruzada entre los grupos a los cuales se les ha asociado la enfermedad de la marchitez bacteriana.

Esta herramienta permitirá facilitar la detección temprana de la enfermedad para programas de cuarentena vegetal, certificación de variedades vegetales y para la aplicación de prácticas de intervención oportuna.

Por lo tanto, como conclusión principal, se obtuvo que las hipótesis de este proyecto no fueron rechazadas. Los medios selectivos aislaron bacterias saprofitas de suelo, incluida *R. solanacearum*; y en particular, a través del estudio del gen completo del 16S ribosomal y sus copias, es posible determinar la composición axénica de cada uno de los aislamientos, considerando que la identificación correcta de especies en función de la similitud de su secuencia debe ser de un 100% para los estudios del gen 16S ADNr.

Además, la metodología diseñada especialmente para este trabajo tiene el potencial de ser una herramienta de identificación de otros patógenos, especialmente para realizar un correcto diagnóstico de la enfermedad.

10. REFERENCIAS

- Abellan-Schneyder, I., Matchado, M. S., Reitmeier, S., Sommer, A., Sewald, Z., Baumbach, J., List, M., & Neuhaus, K. (2021). Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *MSphere*, 6(1), e01202-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01202-20>
- Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V., & Polz, M. F. (2004). Divergence and Redundancy of 16S rRNA Sequences in Genomes with Multiple *rrn* Operons. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.186.9.2629-2635.2004>
- Ahmed, N. N., Islam, Md. R., Hossain, M. A., Meah, M. B., & Hossain, M. M. (2013). Determination of Races and Biovars of *Ralstonia solanacearum* Causing Bacterial Wilt Disease of Potato. *Journal of Agricultural Science*, 5(6), p86. <https://doi.org/10.5539/jas.v5n6p86>
- 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. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.2008/019448-0>
- Álvarez, B., Vasse, J., Le-Courtois, V., Trigalet-Démery, D., López, M. M., & Trigalet, A. (2008). Comparative Behavior of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 in Diverse Plant Species. *Phytopathology*®, 98(1), 59–68. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-1-0059>
- Álvarez Romero, P. I., Grabowski Ocampos, C., Carpio, C., Toro, V. S., Ferreira e Ferreira, A. F. T. A., & Mizubuti, E. S. G. (2021). First Report of *Ralstonia solanacearum* Causing Bacterial Wilt of Eucalyptus in Ecuador. *Plant Disease*, 105(1), 211. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2516-PDN>
- Amir, A., McDonald, D., Navas-Molina, J. A., Kopylova, E., Morton, J. T., Xu, Z. Z., Kightley, E. P., Thompson, L. R., Hyde, E. R., Gonzalez, A., & Knight, R. (2017). Deblur Rapidly Resolves Single-Nucleotide Community Sequence Patterns.

MSystems. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00191-16>

- Baffone, W., Casaroli, A., Citterio, B., Pierfelici, L., Campana, R., Vittoria, E., Guaglianone, E., & Donelli, G. (2006). *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. *International Journal of Food Microbiology*, 107(1), 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.015>
- Bajracharya, M., & Sapkota, M. (2017). Profitability and productivity of potato (*Solanum tuberosum*) in Baglung district, Nepal. *Agriculture and Food Security*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40066-017-0125-5>
- Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 541–555. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009>
- Balvočiūtė, M., & Huson, D. (2017). SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT — how do these taxonomies compare? *BMC Genomics*, 18. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3501-4>
- Bamford, R. A., Smith, A., Metz, J., Glover, G., Titball, R. W., & Pagliara, S. (2017). Investigating the physiology of viable but non-culturable bacteria by microfluidics and time-lapse microscopy. *BMC Biology*, 15(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0465-4>
- Bergsma-Vlami, M., van de Bilt, J. L. J., Tjou-Tam-Sin, N. N. A., Westenberg, M., Meekes, E. T. M., Teunissen, H. A. S., & Van Vaerenbergh, J. (2018). Phylogenetic Assignment of *Ralstonia pseudosolanacearum* (*Ralstonia solanacearum* Phylotype I) Isolated from *Rosa* spp. *Plant Disease*, 102(11), 2258–2267. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1345-RE>
- Beye, M., Fahsi, N., Raoult, D., & Fournier, P.-E. (2017). Careful use of 16S rRNA gene sequence similarity values for the identification of *Mycobacterium* species. *New Microbes and New Infections*, 22, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2017.12.009>
- Blomme, G., Dita, M., Jacobsen, K. S., Pérez Vicente, L., Molina, A., Ocimati, W.,

- Poussier, S., & Prior, P. (2017). Bacterial Diseases of Bananas and Enset: Current State of Knowledge and Integrated Approaches Toward Sustainable Management. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1290. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01290>
- Bocsanczy, A. M., Espindola, A. S., & Norman, D. J. (2019). Whole-Genome Sequences of *Ralstonia solanacearum* Strains P816, P822, and P824, Emerging Pathogens of Blueberry in Florida. *Microbiology Resource Announcements*, 8(3). <https://doi.org/10.1128/MRA.01316-18>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>
- Boyaci, H. F., Kabas, A., Aysan, Y., & Prohens, J. (2021). Screening of eggplant genotypes for resistance to bacterial wilt disease caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. *Plant Protection Science*, 57(No. 2), 112–121. <https://doi.org/10.17221/105/2020-PPS>
- Branton, D., Deamer, D. W., Marziali, A., Bayley, H., Benner, S. A., Butler, T., Di Ventra, M., Garaj, S., Hibbs, A., Huang, X., Jovanovich, S. B., Krstic, P. S., Lindsay, S., Ling, X. S., Mastrangelo, C. H., Meller, A., Oliver, J. S., Pershin, Y. V., Ramsey, J. M., ... Schloss, J. A. (2008). The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nature Biotechnology*, 26(10), 1146–1153. <https://doi.org/10.1038/nbt.1495>
- Brisse, S., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (2006). The Genus *Klebsiella*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 159–196). Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_8
- Buddenhagen, I. W., Sequeira, L., & Kelman, A. (1962). *Designation of races in Pseudomonas solanacearum*.

- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, *13*(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S. M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., Gormley, N., Gilbert, J. A., Smith, G., & Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, *6*(8), 1621–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Carstensen, G. D., Venter, S. N., Wingfield, M. J., & Coutinho, T. A. (2017). Two *Ralstonia* species associated with bacterial wilt of Eucalyptus. *Plant Pathology*, *66*(3), 393–403. <https://doi.org/10.1111/ppa.12577>
- Caruso, P., Palomo, J. L., Bertolini, E., Álvarez, B., López, M. M., & Biosca, E. G. (2005). Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river: Recovery of stressed cells at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(1), 140–148. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.140-148.2005>
- Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, *69*(2), 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>
- Chew, K. L., La, M.-V., Lin, R. T. P., & Teo, J. W. P. (2017). Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-Resistant and mcr-Positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with Broth Microdilution. *Journal of Clinical Microbiology*, *55*(9), 2609–2616. <https://doi.org/10.1128/JCM.00268-17>
- Church, D. L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A., & Emler, S. (2020). Performance and Application of 16S rRNA Gene Cycle Sequencing for Routine Identification of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, *33*(4), e00053-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-19>
- CIAMPI-PANNO, L. (1984). Bacterial wilt of potato in Chile. *Bacterial Wilt of Potato in Chile*, *68*(9), 822–823.

- ClarridgeIII, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R., & Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), D633–D642. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1244>
- D'Amore, R., Ijaz, U. Z., Schirmer, M., Kenny, J. G., Gregory, R., Darby, A. C., Shakya, M., Podar, M., Quince, C., & Hall, N. (2016). A comprehensive benchmarking study of protocols and sequencing platforms for 16S rRNA community profiling. *BMC Genomics*, *17*(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2194-9>
- Deng, X., Zhang, N., Shen, Z., Zhu, C., Liu, H., Xu, Z., Li, R., Shen, Q., & Salles, J. F. (2021). Soil microbiome manipulation triggers direct and possible indirect suppression against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Npj Biofilms and Microbiomes*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00204-9>
- Denny, T. (2006a). Plant pathogenic *Ralstonia* species. In *Plant-Associated Bacteria* (Vol. 9781402045, pp. 573–644). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_16
- Denny, T. (2006b). Plant pathogenic *Ralstonia* species. In *Plant-Associated Bacteria* (Vol. 9781402045, pp. 573–644). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_16
- DeSantis, T. Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E. L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., & Andersen, G. L. (2006). Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(7), 5069–5072. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>
- 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.
<https://doi.org/10.1007/s00425-012-1694-y>

- Ebili, H. O., Hassall, J. C., Fadhil, W., Ham-Karim, H., Asiri, A., Raposo, T. P., Agboola, A. J., & Ilyas, M. (2017). “Squirrel” Primer-Based PCR Assay for Direct and Targeted Sanger Sequencing of Short Genomic Segments. *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, 28(3), 97–110. <https://doi.org/10.7171/jbt.17-2803-001>
- Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., Bibillo, A., Bjornson, K., Chaudhuri, B., Christians, F., Cicero, R., Clark, S., Dalal, R., deWinter, A., Dixon, J., ... Turner, S. (2009). Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science*, 323(5910), 133–138. <https://doi.org/10.1126/science.1162986>
- Elazouni, I., Abdel-Aziz, S., & Rabea, A. (2019). Microbial efficacy as biological agents for potato enrichment as well as bio-controls against wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(2), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2596-y>
- Elphinstone, J. G. (1996a). Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in cool climates. *Potato Research*, 39(SPEC. ISS.), 403–410. <https://doi.org/10.1007/bf02357946>
- Elphinstone, J. G. (1996b). Survival and possibilities for extinction of *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Smith in cool climates. *Potato Research*, 39(SPEC. ISS.), 403–410. <https://doi.org/10.1007/bf02357946>
- 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(3–4), 663–678. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.1996.tb01511.x>
- Espejo, R. T., & Plaza, N. (2018). Multiple Ribosomal RNA Operons in Bacteria; Their Concerted Evolution and Potential Consequences on the Rate of Evolution of Their 16S rRNA. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1232. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01232>

- Fadeev, E., Cardozo-Mino, M. G., Rapp, J. Z., Bienhold, C., Salter, I., Salman-Carvalho, V., Molari, M., Tegetmeyer, H. E., Buttigieg, P. L., & Boetius, A. (2021). Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3–V4 and V4–V5) for Studies of Arctic Microbial Communities. *Frontiers in Microbiology*, 12, 283. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.637526>
- Fegan, M., & Prior, P. (2005). How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*, 449–461.
- Ferreira, M. A., Mafia, R. G., & Alfenas, A. C. (2018). *Ralstonia solanacearum* decreases volumetric growth of trees and yield of kraft cellulose of *Eucalyptus* spp. *Forest Pathology*, 48(1), e12376. <https://doi.org/10.1111/efp.12376>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 14, Issue 9, pp. 563–575). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Fouhy, F., Deane, J., Rea, M. C., O’Sullivan, Ó., Ross, R. P., O’Callaghan, G., Plant, B. J., & Stanton, C. (2015). The Effects of Freezing on Faecal Microbiota as Determined Using MiSeq Sequencing and Culture-Based Investigations. *PLOS ONE*, 10(3), e0119355. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119355>
- Franco-Duarte, R., Černáková, L., Kadam, S., S. Kaushik, K., Salehi, B., Bevilacqua, A., Corbo, M. R., Antolak, H., Dybka-Stępień, K., Leszczewicz, M., Relison Tintino, S., Alexandrino de Souza, V. C., Sharifi-Rad, J., Melo Coutinho, H. D., Martins, N., & Rodrigues, C. F. (2019). Advances in Chemical and Biological Methods to Identify Microorganisms—From Past to Present. *Microorganisms*, 7(5), 130. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050130>
- Fuks, G., Elgart, M., Amir, A., Zeisel, A., Turnbaugh, P. J., Soen, Y., & Shental, N. (2018). Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome*, 6(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0396-x>
- Fukuda, K., OGAWA, M., TANIGUCHI, H., & Saito, M. (2016). Molecular Approaches to

- Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *Journal of UOEH*, 38, 223–232. <https://doi.org/10.7888/juoeh.38.223>
- García, R. O., Kerns, J. P., & Thiessen, L. (2019). *Ralstonia solanacearum* species complex: A quick diagnostic guide. *Plant Health Progress*, 20(1), 7–13. <https://doi.org/10.1094/PHP-04-18-0015-DG>
- García-González, T., Sáenz-Hidalgo, H. K., Silva-Rojas, H. V., Morales-Nieto, C., Vancheva, T., Koebnik, R., & Ávila-Quezada, G. D. (2018). Enterobacter cloacae, an Emerging Plant-Pathogenic Bacterium Affecting Chili Pepper Seedlings. *The Plant Pathology Journal*, 34(1), 1–10. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.06.2017.0128>
- Genin, S., & Denny, T. P. (2012). Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Annual Review of Phytopathology*, 50(1), 67–89. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-173000>
- Ghezzi, J. I., & Steck, T. R. (1999). Induction of the viable but non-culturable condition in *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* in liquid microcosms and sterile soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 30(3), 203–208. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1999.tb00648.x>
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Graham, J., & Lloyd, A. B. (1979a). Survival of potato strain (race 3) of *Pseudomonas solanacearum* in the deeper soil layers. *Australian Journal of Agricultural Research*, 30(3), 489–496. <https://doi.org/10.1071/AR9790489>
- Graham, J., & Lloyd, A. B. (1979b). Survival of potato strain (race 3) of *Pseudomonas solanacearum* in the deeper soil layers. *Australian Journal of Agricultural Research*, 30(3), 489–496. <https://doi.org/10.1071/AR9790489>
- Grey, B. E., & Steck, T. R. (2001). The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3866–3872.

<https://doi.org/10.1128/aem.67.9.3866-3872.2001>

- Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (2006). The Genus *Serratia*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 219–244). Springer New York. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_11
- Hallmaier-Wacker, L. K., Lüert, S., Gronow, S., Spröer, C., Overmann, J., Buller, N., Vaughan-Higgins, R. J., & Knauf, S. (2019). A Metataxonomic Tool to Investigate the Diversity of *Treponema*. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.02094>
- Haro, C., Anguita-Maeso, M., Metsis, M., Navas-Cortés, J. A., & Landa, B. B. (2021). Evaluation of Established Methods for DNA Extraction and Primer Pairs Targeting 16S rRNA Gene for Bacterial Microbiota Profiling of Olive Xylem Sap. *Frontiers in Plant Science*, 12, 640829. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.640829>
- Haverkort, A. J., & Struik, P. C. (2015a). Yield levels of potato crops: Recent achievements and future prospects. *Field Crops Research*, 182, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.06.002>
- Haverkort, A. J., & Struik, P. C. (2015b). Yield levels of potato crops: Recent achievements and future prospects. *Field Crops Research*, 182, 76–85. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2015.06.002>
- Hayward, A. C. (1964a). Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 27(2), 265–277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1964.tb04912.x>
- Hayward, A. C. (1964b). Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 27(2), 265–277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1964.tb04912.x>
- Hayward, A. C. (1991a). Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 29(1), 65–87. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.000433>
- Hayward, A. C. (1991b). Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 29(1), 65–87.

<https://doi.org/10.1146/annurev.py.29.090191.000433>

- He, L. Y. (1983). Characteristics of Strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Disease*, 67(12), 1357. <https://doi.org/10.1094/PD-67-1357>
- HIKICHI, Y. (2016). Interactions between plant pathogenic bacteria and host plants involved in establishment of susceptibility. *Japanese Journal of Phytopathology*, 82(3), 156–159. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.82.156>
- Hong, J. C., Momol, M. T., Jones, J. B., Ji, P., Olson, S. M., Allen, C., Perez, A., Pradhanang, P., & Guven, K. (2008). Detection of *Ralstonia solanacearum* in Irrigation Ponds and Aquatic Weeds Associated with the Ponds in North Florida. *Plant Disease*, 92(12), 1674–1682. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-12-1674>
- Hong, J., Ji, P., Momol, M. T., Jones, J. B., Olson, S. M., Pradhanang, P., & Guven, K. (2005). *Ralstonia solanacearum* detection in tomato irrigation ponds and weeds. *Acta Horticulturae*, 695, 309–311. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2005.695.36>
- Hossain, Md. F., Billah, M., Ali, M. R., Parvez, Md. S. A., Zaoti, Z. F., Hasan, S. M. Z., Hasan, Md. F., Dutta, A. K., Khalekuzzaman, Md., Islam, Md. A., & Sikdar, B. (2021). Molecular identification and biological control of *Ralstonia solanacearum* from wilt of papaya by natural compounds and *Bacillus subtilis*: An integrated experimental and computational study. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(12), 6972–6986. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.069>
- Imazaki, I., & Nakaho, K. (2009). Pyruvate-amended modified SMSA medium: Improved sensitivity for detection of *Ralstonia solanacearum*. *Journal of General Plant Pathology*, 76, 52–61. <https://doi.org/10.1007/s10327-009-0208-7>
- Jacobs, J. M., Babujee, L., Meng, F., Milling, A., & Allen, C. (2012). The in planta transcriptome of *Ralstonia solanacearum*: Conserved physiological and virulence strategies during bacterial wilt of tomato. *MBio*, 3(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00114-12>
- Jeevan, U., Kurian, P. S., Sreelatha, U., Mathew, D., & Narayanankutty, C. (2021). Morphological, symptomatological and molecular characterization of

- Enterobacter cloacae causing bacterial wilt in African marigold (*Tagetes erecta* L.). *Indian Phytopathology*. <https://doi.org/10.1007/s42360-021-00414-3>
- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 236, Issue 2, pp. 163–173). <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.005>
- Jiang, G., Wei, Z., Xu, J., Chen, H., Zhang, Y., She, X., Macho, A. P., Ding, W., & Liao, B. (2017). Bacterial Wilt in China: History, Current Status, and Future Perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1549. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01549>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 5029. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Kai, S., Matsuo, Y., Nakagawa, S., Kryukov, K., Matsukawa, S., Tanaka, H., Iwai, T., Imanishi, T., & Hirota, K. (2019). Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION™ nanopore sequencer. *FEBS Open Bio*, 9(3), 548–557. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12590>
- Kalpage, M., & Costa, D. (2015). Isolation of bacteriophages and determination of their efficiency in controlling *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of tomato. *Tropical Agricultural Research*, 26, 140. <https://doi.org/10.4038/tar.v26i1.8079>
- Karim, Z., & Hossain, M. (2018). Management of bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) of potato: Focus on natural bioactive compounds. *Journal of Biodiversity Conservation and Bioresource Management*, 4(1), 73–92. <https://doi.org/10.3329/jbcbm.v4i1.37879>
- Kheirandish, Z., & Harighi, B. (2015). Evaluation of bacterial antagonists of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt of potato. *Biological Control*, 86. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.03.007>
- Klappenbach, J. A., Dunbar, J. M., & Schmidt, T. M. (2000). RRNA Operon Copy Number

Reflects Ecological Strategies of Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1328-1333.2000>

Klemetsen, T., Willassen, N. P., & Karlsen, C. R. (2019). Full-length 16S rRNA gene classification of Atlantic salmon bacteria and effects of using different 16S variable regions on community structure analysis. *MicrobiologyOpen*, 8(10), e898. <https://doi.org/10.1002/mbo3.898>

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1–e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>

Kong, H. G., Bae, J. Y., Lee, H. J., Joo, H. J., Jung, E. J., Chung, E., & Lee, S. W. (2014). Induction of the viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* by low temperature in the soil microcosm and its resuscitation by catalase. *PLoS ONE*, 9(10), e109792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109792>

Kumar, S., nath, K., Hamsaveni, N., Ramanjini Gowda, P. H., Rohini, I. B., Rangaswamy, K. T., & Achari, R. (2017). Isolation and Characterization of *Ralstonia solanacearum* Causing Bacterial Wilt of Solanaceae Crops. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(5), 1173–1190. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.128>

Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 5, Issue 1, pp. 48–56). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1557>

Lewis, K. (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 322, pp. 107–131). https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_6

Lewis, K. (2010a). Persister Cells. *Annual Review of Microbiology*, 64(1), 357–372. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>

Lewis, K. (2010b). Persister Cells. *Annual Review of Microbiology*, 64(1), 357–372. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J. D., & Faucher, S. P. (2014). The importance of the

- viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 5, 258. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00258>
- Liu, J., Zhao, Z., & Wang, C. (2020). First Report of Rhizome Rot on Ginger (*Zingiber officinale*) Caused by *Enterobacter cloacae* in Shandong Province, China. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-1108-PDN>
- Liu, X., Zhang, S., Jiang, Q., Bai, Y., Shen, G., Li, S., & Ding, W. (2016). Using community analysis to explore bacterial indicators for disease suppression of tobacco bacterial wilt. *Scientific Reports*, 6(1), 36773. <https://doi.org/10.1038/srep36773>
- Loutet, S. A., & Valvano, M. A. (2011). Extreme antimicrobial Peptide and polymyxin B resistance in the genus burkholderia. *Frontiers in Microbiology*, 2, 159. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00159>
- Lu, J., & Salzberg, S. L. (2020). Ultrafast and accurate 16S rRNA microbial community analysis using Kraken 2. *Microbiome*, 8(1), 124. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00900-2>
- Mamphogoro, T. P., Kamutando, C. N., Maboko, M. M., Aiyegoro, O. A., & Babalola, O. O. (2021). Epiphytic Bacteria from Sweet Pepper Antagonistic In Vitro to *Ralstonia solanacearum* BD 261, a Causative Agent of Bacterial Wilt. *Microorganisms*, 9(9), 1947. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091947>
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G., & Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. In *Molecular Plant Pathology* (Vol. 13, Issue 6, pp. 614–629). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x>
- Mardis, E. R. (2017). DNA sequencing technologies: 2006-2016. *Nature Protocols*, 12(2), 213–218. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.182>
- Martins, P. M. M., Merfa, M. V., Takita, M. A., & De Souza, A. A. (2018). Persistence in phytopathogenic bacteria: Do we know enough? In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue MAY). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01099>
- McNEW, G. L. (1960). The nature, origin and evolution of parasitism. In: *HORSFALL, J.*

- G.; DIMOND, A.E. (Ed.). *Plant Pathology: An Advanced Treatise*. New York, Academic Press, 2, 19–69.
- Milling, A., Babujee, L., & Allen, C. (2011). *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants. *PLoS ONE*, 6(1), e15853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015853>
- Milling, A., Meng, F., Denny, T. P., & Allen, C. (2009). *Interactions with Hosts at Cool Temperatures, Not Cold Tolerance, Explain the Unique Epidemiology of Ralstonia solanacearum Race 3 Biovar 2*. 99(10), 1127. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-10-1127>
- Mori, Y., Ishikawa, S., Ohnishi, H., Shimatani, M., Morikawa, Y., Hayashi, K., Ohnishi, K., Kiba, A., Kai, K., & Hikichi, Y. (2018a). Involvement of ralfuranones in the quorum sensing signalling pathway and virulence of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Molecular Plant Pathology*, 19(2), 454–463. <https://doi.org/10.1111/mpp.12537>
- Mori, Y., Ishikawa, S., Ohnishi, H., Shimatani, M., Morikawa, Y., Hayashi, K., Ohnishi, K., Kiba, A., Kai, K., & Hikichi, Y. (2018b). Involvement of ralfuranones in the quorum sensing signalling pathway and virulence of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Molecular Plant Pathology*, 19(2), 454–463. <https://doi.org/10.1111/mpp.12537>
- Nascimento, F. X., Glick, B. R., & Rossi, M. J. (2019). Isolation and characterization of novel soil- and plant-associated bacteria with multiple phytohormone-degrading activities using a targeted methodology. *Access Microbiology*, 1(7), e000053. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000053>
- Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302(1), 205–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>
- Nygaard, A. B., Tunsjø, H. S., Meisal, R., & Charnock, C. (2020). A preliminary study on the potential of Nanopore MinION and Illumina MiSeq 16S rRNA gene sequencing to characterize building-dust microbiomes. *Scientific Reports*, 10, 3209. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59771-0>
- Obrador-Sánchez, J. A., Tzec-Simá, M., Canto-Canché, B., Higuera-Ciapara, I.,

- Obrador-Sánchez, J. A., Tzec-Simá, M., Canto-Canché, B., & Higuera-Ciapara, I. (2017). Técnicas para el aislamiento, identificación y caracterización molecular de cepas de *Ralstonia solanacearum* relacionadas a Moko del plátano. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(3), 509–533. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1705-1>
- Okonechnikov, K., Golosova, O., & Fursov, M. (2012a). Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Okonechnikov, K., Golosova, O., & Fursov, M. (2012b). Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28(8), 1166–1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- Olaitan, A. O., Morand, S., & Rolain, J.-M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 5, 643. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643>
- Palleroni, N. J. (2015). *Burkholderia*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–50). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00935>
- Parks, D. H., Chuvochina, M., Rinke, C., Mussig, A. J., Chaumeil, P.-A., & Hugenholtz, P. (2022). GTDB: An ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D785–D794. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab776>
- Patrice G. Champoiseau. (2009a). *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2. *Ralstonia solanacearum* Raza 3 Biovar 2.
- Patrice G. Champoiseau. (2009b). *Ralstonia solanacearum* raza 3 biovar 2 . *Ralstonia solanacearum* Raza 3 Biovar 2 . https://plantpath.ifas.ufl.edu/rsol/RalstoniaPublications_PDF/Ralstonia_solanacearum_ES_PDF.pdf
- Paudel, S., Dobhal, S., Alvarez, A. M., & Arif, M. (2020). Taxonomy and Phylogenetic

- Research on *Ralstonia solanacearum* Species Complex: A Complex Pathogen with Extraordinary Economic Consequences. *Pathogens*, 9(11), 886. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110886>
- Peeters, N., Guidot, A., Vaillau, F., & Valls, M. (2013a). *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Molecular Plant Pathology*, 14(7), 651. <https://doi.org/10.1111/MPP.12038>
- Peeters, N., Guidot, A., Vaillau, F., & Valls, M. (2013b). *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Molecular Plant Pathology*, 14(7), 651–662. <https://doi.org/10.1111/mpp.12038>
- Pei, A. Y., Oberdorf, W. E., Nossa, C. W., Agarwal, A., Chokshi, P., Gerz, E. A., Jin, Z., Lee, P., Yang, L., Poles, M., Brown, S. M., Sotero, S., Desantis, T., Brodie, E., Nelson, K., & Pei, Z. (2010). Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12), 3886–3897. <https://doi.org/10.1128/AEM.02953-09>
- Persing, Tenover, Hayden, Ieven, Miller, Nolte, Tang, & van Belkum (Eds.). (2016). Next-Generation Sequencing. In *Molecular Microbiology* (pp. 68–79). American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555819071.ch6>
- Peterson, D., Bonham, K. S., Rowland, S., Pattanayak, C. W., RESONANCE Consortium, Klepac-Ceraj, V., Deoni, S. C. L., D'Sa, V., Bruchhage, M., Volpe, A., Beauchemin, J., Wallace, C., Rogers, J., Cano, R., Fernandes, J., Walsh, E., Rhodes, B., Huentelman, M., Lewis, C., ... Braun, J. (2021). Comparative Analysis of 16S rRNA Gene and Metagenome Sequencing in Pediatric Gut Microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1651. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.670336>
- Peyraud, R., Cottret, L., Marmiesse, L., Gouzy, J., & Genin, S. (2016). A Resource Allocation Trade-Off between Virulence and Proliferation Drives Metabolic Versatility in the Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum*. *PLoS Pathogens*, 12(10), e1005939. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005939>
- Poussier, S., Chéron, J.-J., Couteau, A., & Luisetti, J. (2002). Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural

- substrates. *Journal of Microbiological Methods*, 51(3), 349–359.
[https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00111-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00111-2)
- Pu, Y., Ke, Y., & Bai, F. (2017). Active efflux in dormant bacterial cells – New insights into antibiotic persistence. *Drug Resistance Updates*, 30, 7–14.
<https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.11.002>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Rahma, H., Sinaga, M., Memen, S., & Giyanto, G. (2014). First report of Stewart's wilt of maize caused by *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii* in Bogor district, Indonesia. *Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences*, 20, 131–141.
- Ralstonia solanacearum*. (2004). *EPPO Bulletin*, 34(2), 173–178.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2004.00715.x>
- Rizal, N., Neoh, H., Ramli, R., Periyasamy, P., Hanafiah, A., Abdul Samat, M., Tan, T. L., Kon Ken, W., Nathan, S., Chieng, S., Saw, S., & Khor, B. (2020). Advantages and Limitations of 16S rRNA Next-Generation Sequencing for Pathogen Identification in the Diagnostic Microbiology Laboratory: Perspectives from a Middle-Income Country. *Diagnostics*, 10, 816. <https://doi.org/10.3390/diagnostics10100816>
- Robben, C., Fister, S., Witte, A. K., Schoder, D., Rossmanith, P., & Mester, P. (2018). Induction of the viable but non-culturable state in bacterial pathogens by household cleaners and inorganic salts. *Scientific Reports*, 8(1), 15132. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33595-5>
- Roller, B. R. K., Stoddard, S. F., & Schmidt, T. M. (2016). Exploiting rRNA operon copy number to investigate bacterial reproductive strategies. *Nature Microbiology*, 1(11), 1–7. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.160>
- Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Research*, 11(1), 3–11. <https://doi.org/10.1101/gr.11.1.3>

- Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1), 39–67. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00571.x>
- 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_9), 3087–3103. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.066712-0>
- Sanford, R. A., Lloyd, K. G., Konstantinidis, K. T., & Löffler, F. E. (2021). Microbial Taxonomy Run Amok. *Trends in Microbiology*, 29(5), 394–404. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.12.010>
- Sanogo, S., Etarock, B. F., & Clary, M. (2011). First Report of Bacterial Wilt Caused by *Erwinia tracheiphila* on Pumpkin and Watermelon in New Mexico. *Plant Disease*, 95(12), 1583. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-11-0507>
- Santiago, T. R., Grabowski, C., Rossato, M., Romeiro, R. S., & Mizubuti, E. S. G. (2015). Biological control of eucalyptus bacterial wilt with rhizobacteria. *Biological Control*, 80, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.09.007>
- Sarkar, S., & Chaudhuri, S. (2015). New report of additional enterobacterial species causing wilt in West Bengal, India. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(7), 477–486. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0017>
- 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. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.263>
- Scherf, J. M., Milling, A., & Allen, C. (2010). Moderate temperature fluctuations rapidly reduce the viability of *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, in infected

- geranium, tomato, and potato plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 7061–7067. <https://doi.org/10.1128/AEM.01580-10>
- Scholthof, K.-B. G. (2007). The disease triangle: Pathogens, the environment and society. *Nature Reviews Microbiology*, 5(2), 152–156. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1596>
- Seal, Taghavi, Fegan, Hayward, & Fegan. (1999). Determination of *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum* rDNA subgroups by PCR tests. *Plant Pathology*, 48(1), 115–120. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00322.x>
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Shapiro, L. R., Paulson, J. N., Arnold, B. J., Scully, E. D., Zhaxybayeva, O., Pierce, N. E., Rocha, J., Klepac-Ceraj, V., Holton, K., & Kolter, R. (2018). An Introduced Crop Plant Is Driving Diversification of the Virulent Bacterial Pathogen *Erwinia tracheiphila*. *MBio*. <https://doi.org/10.1128/mBio.01307-18>
- Sharma, P., Johnson, M. A., Mazloom, R., Allen, C., Heath, L. S., Lowe-Power, T. M., & Vinatzer, B. A. (2021). *Meta Analysis of the Ralstonia solanacearum species complex (RSSC) based on comparative evolutionary genomics and reverse ecology* [Preprint]. *Genomics*. <https://doi.org/10.1101/2021.12.05.471342>
- She, X., Yu, L., Lan, G., Tang, Y., & He, Z. (2017a). Identification and Genetic Characterization of *Ralstonia solanacearum* Species Complex Isolates from *Cucurbita maxima* in China. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1794. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01794>
- She, X., Yu, L., Lan, G., Tang, Y., & He, Z. (2017b). Identification and Genetic Characterization of *Ralstonia solanacearum* Species Complex Isolates from *Cucurbita maxima* in China. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1794. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01794>
- Stackebrandt, E., & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species

- Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(4), 846–849. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-4-846>
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(9), 1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Stevens, L. H., van der Zouwen, P. S., van Tongeren, C. A. M., Kastelein, P., & van der Wolf, J. M. (2018). Survival of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia pseudosolanacearum* in drain water. *EPPO Bulletin*, 48(1), 97–104. <https://doi.org/10.1111/epp.12450>
- Sun, D.-L., Jiang, X., Wu, Q. L., & Zhou, N.-Y. (2013). Intragenomic Heterogeneity of 16S rRNA Genes Causes Overestimation of Prokaryotic Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AEM.01282-13>
- Tan, S., Dong, Y., Liao, H., Huang, J., Song, S., Xu, Y., & Shen, Q. (2013). Antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* induces resistance and controls the bacterial wilt of tomato. *Pest Management Science*, 69(11), 1245–1252. <https://doi.org/10.1002/ps.3491>
- Tayeb, L. A., Lefevre, M., Passet, V., Diancourt, L., Brisse, S., & Grimont, P. A. D. (2008). Comparative phylogenies of *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Comamonas*, *Brevundimonas* and related organisms derived from *rpoB*, *gyrB* and *rrs* gene sequences. *Research in Microbiology*, 159(3), 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.12.005>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Timila, R. D., & Manandhar, S. (2016). Biovar Differentiation and Variation in Virulence of *Ralstonia solanacearum* Isolates Infecting Solanaceous Vegetables. *Journal of Nepal Agricultural Research Council*, 2, 22–26. <https://doi.org/10.3126/jnarc.v2i0.16117>

- Tondo, M. L., de Pedro-Jové, R., Vandecaveye, A., Piskulic, L., Orellano, E. G., & Valls, M. (2020). KatE From the Bacterial Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Is a Monofunctional Catalase Controlled by HrpG That Plays a Major Role in Bacterial Survival to Hydrogen Peroxide. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2020.01156>
- Tsuda, K., Kosaka, Y., Tsuge, S., Kubo, Y., & Horino, O. (2001). Evaluation of the Endophyte *Enterobacter cloacae* SM10 Isolated from Spinach Roots for Biological Control against Fusarium Wilt of Spinach. *Journal of General Plant Pathology*, 67(1), 78–84. <https://doi.org/10.1007/PL00012993>
- van der Wolf, J. M., Acuña, I., De Boer, S. H., Brurberg, M. B., Cahill, G., Charkowski, A. O., Coutinho, T., Davey, T., Dees, M. W., Degefu, Y., Dupuis, B., Elphinstone, J. G., Fan, J., Fazelisanagri, E., Fleming, T., Gerayeli, N., Gorshkov, V., Helias, V., le Hingrat, Y., ... Yedidia, I. (2021). Diseases Caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* Species Around the World. In F. Van Gijsegem, J. M. van der Wolf, & I. K. Toth (Eds.), *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species* (pp. 215–261). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-61459-1_7
- Van Elsas, 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(12), 1358–1366. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.12.1358>
- Van Gijsegem, F., van der Wolf, J. M., & Toth, I. K. (Eds.). (2021). *Plant Diseases Caused by Dickeya and Pectobacterium Species*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-61459-1>
- Van Goethem, M. W., Osborn, A. R., Bowen, B. P., Andeer, P. F., Swenson, T. L., Clum, A., Riley, R., He, G., Koriabine, M., Sandor, L., Yan, M., Daum, C. G., Yoshinaga, Y., Makhalanyane, T. P., Garcia-Pichel, F., Visel, A., Pennacchio, L. A., O'Malley, R. C., & Northen, T. R. (2021). Long-read metagenomics of soil communities reveals phylum-specific secondary metabolite dynamics. *Communications*

- Biology*, 4(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02809-4>
- Van Overbeek, L. S., Bergervoet, J. H. W., Jacobs, F. H. H., & Van Elsas, J. D. (2004). The low-temperature-induced viable-but-nonculturable state affects the virulence of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2. *Phytopathology*, 94(5), 463–469. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.5.463>
- Vasconez, I. N., Besoain, X., Vega-Celedón, P., Valenzuela, M., & Seeger, M. (2020). First Report of Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum* Phylotype IIB Sequevar 1 Affecting Tomato in Different Regions of Chile. *Plant Disease*, 104(7), 2023. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-20-0181-PDN>
- Vasse, J. (1995). Microscopic Studies of Intercellular Infection and Protoxylem Invasion of Tomato Roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8(2), 241. <https://doi.org/10.1094/MPMI-8-0241>
- Větrovský, T., & Baldrian, P. (2013). The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. *PLOS ONE*, 8(2), e57923. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057923>
- Waite, D. W., Chuvochina, M., Pelikan, C., Parks, D. H., Yilmaz, P., Wagner, M., Loy, A., Naganuma, T., Nakai, R., Whitman, W. B., Hahn, M. W., Kuever, J., & Hugenholtz, P. 2020. (n.d.). Proposal to reclassify the proteobacterial classes Deltaproteobacteria and Oligoflexia, and the phylum Thermodesulfobacteria into four phyla reflecting major functional capabilities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), 5972–6016. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004213>
- Wang, G. F., Praphat, K., Xie, G. L., Zhu, B., Li, B., Liu, B., & Zhou, Q. (2008). Bacterial Wilt of Mulberry (*Morus alba*) Caused by *Enterobacter cloacae* in China. *Plant Disease*, 92(3), 483–483. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-3-0483B>
- Wei, Z., Huang, J., Yang, T., Jousset, A., Xu, Y., Shen, Q., & Friman, V.-P. (2017). Seasonal variation in the biocontrol efficiency of bacterial wilt is driven by temperature-mediated changes in bacterial competitive interactions. *Journal of Applied Ecology*, 54(5), 1440–1448. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12873>

- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, *173*(2), 697–703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- Wen, T., Zhao, M., Liu, T., Huang, Q., Yuan, J., & Shen, Q. (2020). High abundance of *Ralstonia solanacearum* changed tomato rhizosphere microbiome and metabolome. *BMC Plant Biology*, *20*(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02365-9>
- Winand, R., Bogaerts, B., Hoffman, S., Lefevre, L., Delvoye, M., Braekel, J., Fu, Q., Roosens, N., Keersmaecker, S., & Vanneste, K. (2019). Targeting the 16S rRNA Gene for Bacterial Identification in Complex Mixed Samples: Comparative Evaluation of Second (Illumina) and Third (Oxford Nanopore Technologies) Generation Sequencing Technologies. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*, 298. <https://doi.org/10.3390/ijms21010298>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tse, H., & Yuen, K.-Y. (2008). Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*(10), 908–934. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x>
- Wood, T. K., Knabel, S. J., & Kwan, B. W. (2013). Bacterial persister cell formation and dormancy. In *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 79, Issue 23, pp. 7116–7121). <https://doi.org/10.1128/AEM.02636-13>
- 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. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3697-3708.2006>
- Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F. O., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., Whitman, W. B., Euzéby, J., Amann, R., & Rosselló-Móra, R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(9), 635–645. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3330>
- Yilmaz, P., Parfrey, L. W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., & Glöckner, F. O. (2014). The SILVA and “All-species

- Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D643–D648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1209>
- Youssef, N., Sheik, C. S., Krumholz, L. R., Najar, F. Z., Roe, B. A., & Elshahed, M. S. (2009). Comparison of Species Richness Estimates Obtained Using Nearly Complete Fragments and Simulated Pyrosequencing-Generated Fragments in 16S rRNA Gene-Based Environmental Surveys. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(16), 5227–5236. <https://doi.org/10.1128/AEM.00592-09>
- Yuliar, Asi Nion, Y., & Toyota, K. (2015). Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microbes and Environments*, 30(1), 1–11. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14144>
- Zheng, J., Zhu, J., Chen, B., Chen, L., Gao, T., Chen, X., & Li, F. (2021). Application of 16S rDNA Sequencing Technology in the Analysis of Pathogenic Bacteria in Sputum of Severe Pneumonia. *Advances in Microbiology*, 11, 157–164. <https://doi.org/10.4236/aim.2021.113011>
- Zheng, W., Tsompana, M., Ruscitto, A., Sharma, A., Genco, R., Sun, Y., & Buck, M. (2015). An accurate and efficient experimental approach for characterization of the complex oral microbiota. *Microbiome*, 3. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0110-9>
- Zhu, B., Wang, G., Xie, G., Zhou, Q., Zhao, M., Praphat, K., Li, B., & Tian, W. (2010a). Enterobacter spp.: A new evidence causing bacterial wilt on mulberry. *Science China Life Sciences*, 53(2), 292–300. <https://doi.org/10.1007/s11427-010-0048-x>
- Zhu, B., Wang, G., Xie, G., Zhou, Q., Zhao, M., Praphat, K., Li, B., & Tian, W. (2010b). Enterobacter spp.: A new evidence causing bacterial wilt on mulberry. *Science China Life Sciences*, 53(2), 292–300. <https://doi.org/10.1007/s11427-010-0048-x>

11. ANEXOS

Anexo 1. Secuencias genómicas de los aislamientos bacterianos: Fusión de productos de PCR 27f-1492r y 341f-907r en una secuencia del gen ADNr 16S de longitud completa.

>C1_Tuberculo

GGTAATGGCTCACCTAGGGGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGC
GAGGAGGAAGGGTTACAGTGTAAATAGCACTGTTCACTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GGAGGGTGCAACGCTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGACGAGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGCGCTTAACGTGGGA
ACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTTGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGG
TGGCAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTA
AACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGTAAACGCGTTAAGTCGACCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA
AACTCAAATGAATGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAG
AGAATTCGCTAGAGATGCTTAGTCCCTTCGGGAACCTGACACAGTGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGTAAATGTTGGTAAAT
CCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGCTAATGGCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCGTTGATAAACCGGAGGAAGGTG

>C2_Tuberculo

TAACGCTCTTCGGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCTCACGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGTAGTAGGTTGGGTAATGGCTCAC
TAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGTT
CAGTGTTAATAGCACTGTGCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCG
TTAATCGGAATTAAGCGGCTAAAGCGCACGACGAGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGCGCTTAACGTGGGAACTGCATTTGAAACT
GGCAAGCTAGAGTCTGTAGAGGGGGTGAATTCAGGTTGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC
CCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACAGATGTCGACTTG
GAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCGGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTTG
ACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTCGCTAGAGA
TAGCTTAGTGCTTCGGGAACCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTATCCTTTGTTGCCG

>C3_Tuberculo

TGACGAGCGGGCGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAAAGTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTTCT
CGGACCAAAGTGGGGACCTTCGGGCTCACGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTTGGGTAATGGCTCACCTAGGCGAC
GATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACA
ATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGTTACAGTGTAA
TAGCACTGTTTATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCACGACGAGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGCGCTTAACGTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTA
GAGTCTGTAGAGGGGGTGAATTCAGGTTGAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACA
AAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAACAGATGTCGACTTGGAGGTTGTG
CCCTTGAGGCGTGGCTTCGGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTTGACGGGGCG
CGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTCGCTAGAGATGCTTAG
TGCTTCGGGAACCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGACCAACCCTTAT
CCTTTGTTGCCACCG

>C4_Tuberculo

TGCCGCTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGTTCAAGTGTAAATAGCACTGTTTATTGACGTTACTCG
CAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTACTGGGCGTAAAGCGCACGCA
GGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGCGCTTAACGTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAAT
TCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGGAAAG
CGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTATGTCACGCTGTAACAGCATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGGGCGGCTTCGGGAGC
TAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGG
TTAATTCGATGCAACGCGGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTCGCTAGAGATGCTTAGTGCCTTCGGGAACCTGAGACAGGT
GCTGCATGGCTGCTCAGCTCGTGTGAAATGTT

>C5_Tuberculo

TCGGGTTGTAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGGTTCAAGTGTAAATAGCACTGTTTATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC
GTGCCAGCAGCCGCGTAAACGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGACGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGA
AATCCCCGCGCTTAACGTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCAGCTGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGGGCGTGGCTTCGGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTG
GGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGGAAGAA
CCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAATTCGCTAGAGATGCTTAGTGCCTTCGGGAACCTGAGACAGGTGCTCATGGCTCCACCTCG
TGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCG

>C6_Tuberculo

GAAGAAGGCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTGGTGTCTTACGTTACCGACAGAATAAGCACC
GGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAAACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTTGGTTCGTTAAG
TTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACCTGCATTTAAAACCTGTCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGGTTGGAATTTCTGTGAGCG
GTGAAATGCGTAGATATAGAAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAAGCGTGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTAGCTCTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTT
GACCCCTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCGAA
CGCAAGAACCTTACCAGGCTTACATCCAATGAACCTTCCAGAGATGGAATGGTGCCTTCGGGAACATTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTC
GTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAAACGAGCGCAACCCTTGT

>C7_Tuberculo

CTTCCGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAATACGTTGGTGTCTTACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTC
TGTGCCAGCAGCCGCGTAAACAGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTTGGTTCGTTAAGTTGGATTGTG
AATCCCCGGCTCAACCTGGGAACCTGCATTTAAAACCTGTCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCG

TAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCAGCCGTAACAGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGCCTTGAGCTCTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAAGTTGACCGCCTGG
GGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGGAAGCAACCGCAAGAAC
CTTACCAGGCTTACATCCAATGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTCCCTCGGAAACATTGAGACAGGTTGCATGGCTGTCCAGCTGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGCTTATTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTG
ACAACCCGAGAAAGTGGG
>RS1
AGCAGTGGGGAATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGAAAGCACTTTACGCGA
GGAGAAAGTGGTGAAGCTTAATACGTTTCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG
AGGGTCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACAGCGGCTTTGTTAAGTCAGATGTGAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACT
TGCATTTGAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGAGGGGGTGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTG
GCGAAGGCGCCCGCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTA
CGATGTCGATTGACAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCCTGGGGAGTACGGCCCGCAAGGTTAAAA
CTCAAATGAATGGAGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACCGCAAGAACCTTACCTACTTCCAGATCCAGAG
AACTTTCCAGAGATGGATTGGTCCCTTCGGGAAGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCC
CGCAACGAGCGCAACCTTATCCCTTTGTTGCCAGCGGTTTCGGCCGGGAAGCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAAGTGGAGGAAAGGTTGGGGATG
ACGTCAAGTCAATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACAGTGTCTCAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCT
CATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTGACACCCGCGCTCACACCATGGGAGTGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCGCTTACCACTT
TGATT
>RS2
ATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGAGGGTGAACGCTTAATCGGAATTACTGGGCG
TAAAGCGCACGAGCGGCTGTCAAGTCGGATGTGAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTGCAAACTGGCAGGCTAGAGCTTGTGA
GAGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATCGTAGAGATCTGGAGGAATACCCGTGGCGAAGGCGGCGCCCTGGACAAGAGACTGACG
CTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTATGCCACGCGCTTAAACGATGTCCGACTTTGCTCCCTTAGGA
GTGGCTTCCGGAGCTAACCGCTTAAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATGACGGGGGGCCCGCACAAAG
GTTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACGCAAGAACCTTACCTACTTGGACATCCAGAGAAGTACGAGAGACTTGTGGTCCCTTCGGG
AACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCCTTTGTTG
CAGCGGTTCCGGCGGGAAGCTCAAAGGAGACTCCAGTGTATAAAGTGGAGAAAGTGGGGATGACGTCAAGTCAATCATGGCCCTTACGAGT
GGCTACACAGCTGCTACAAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCACAAAGTATGCTGTAGTCCGGATCGGAGT
CTGCAACTCGACTCCGTAAGTCGGAATCGCTAGTAAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACCCGCGCTC
ACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCG
>RS3
GGCCTTTCTCCCTTAAGATTGCCCCAGGGGGGATTAGTTTGTAGTGGGGTAATGGCTCACCTGGCGCGCCCTCCCTAGTGTGTTGGAGAG
GATGCCCCACCACCGGAAATTGAGACCAGGTCAGATTTCTACGGGAGCGAGCAGTGGGAATTTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAG
CCATGCGCGGTATGAAGAAGGCTTCGGGTTGTAAGTACTTTTTCAGCGAGGAGGAAAGGCAATGTTGGTTAATAACACAGTGTGACGTTAC
TCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCAC
GCAGGCGGCTGTCAAGTCGGATGTGAATCCCGGGCTCAACCTGGGAATCGATTGCAAACTGGCAGGCTAGAGTTGTAGAGGGGGGTA
GAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCCGTGGCGAAGCGCGCCCTGGACAAGACTGACGCTCAGGTGCG
AAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGTACCCTGGTAGTCCACCGCTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCCCTTGGAGAGTGGCTTCC
GAGTAAAGCGTTAAGTCGACCGCTGGGAGTACGGCGCGAAGGTAATTAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTAATTCGATGCAACCGCAAGAACCTTACCTACTTTCGATCCAGAGAAGTACGAGAGATGCTTTGGTGGCTTCGGGAAGCTGTGAGAC
AGTGTCTGCATGGCTGCTGCTAGCTCGTGTGTAAGTGTGGTAACTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTACCTTCTTGGCAGCGGTTCCG
CCGGGAAGCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAAGTGGAGAAAGTGGGGATGACGTCAAGTCAATCATGGCCCTTACGAGTGGGCTACACAGT
GCTACAAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCACAAAGTATGCTGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGAC
TCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACCCGCGCTCACACCATGGGAG
TGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCG
>RS4
AAAAACAAAGGGGGGCTTTGGGCTTTCTCCCTTAAGATTGCCCCAGGGGGGATTAGTTTGTAGTGGGGTAATGGCTCACCTGGCGCGCC
TTCCTAGGTTGTTGGAGAGATGCCCCACCACCGGGAATGAGACCCGCTCCAGATTTCTACGGGAGGAGCAGTGGGAATTTGCACAATGG
ATGGCCGATGCTGATGCAACCTGCGCGTGTATGAAGAAGGCTTCGGGTTGTAAGTACTTTACGAGGAGGAAAGGCAATGTTGGTTAA
TAACACAGTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGGAGGTCGACGCTTAAATCGGA
ATTACTGGGCGTAAAGCGCACAGCGGCTGTGCAAGTCGGATGTGAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTGCAAACTGGCAGGCT
AGAGTCTTGTAGAGGGGGTGAATTCAGGTTGAGCGGTGAAATCGTAGATCTGGAGGAATACCCGTGGCGAAGCGGCGGCTGGAG
AAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGTACCCTGGTAGTCCACCGCTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTG
TCCCTTGGAGGTTGGCTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGG
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACCGCAAGGTAATTAACCTTACGATCTTGCATCCAGAGAAGTACGAGAGTCTTGG
TGCTTCCGGGAAGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTGACGCTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTT
CCTTGTGGCAGGCTTCGGCCGGGAAGCTCAAAGGAGACTGCCAGTGCCTGAGTAAACTGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAAGTCAATCATGG
TACGAGTGGGCTACACAGTGTCAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCACAAAGTATGCTGTAGTCCG
GATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACA
CCGCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCGCTTACGATCTTGTATGCTGAGG
>RS5
CCAAACAAAGGGGGGCTTTGGGCTTTCCCTCAGATGCCCCAAAGGGATTAGTGTAGTGGGGTAATGGCTCACCTGGCGGAGCAT
CCCTAGCTGTTGAGGAGGATGCCAGCCACCCTGGAACTGAGACCCGCTCCAGATTCCTACGGGAGGAGCAGTGGGAATTTGCACAATGG
CGCAAGCCTGATGCAACCTGCGCGTGTATGAAGAAGGCTTCGGGTTGTAAGTACTTTACGCGAGGAGGAAAGGCAATGTTGGTTAATAAC
CACAGTGTACTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGGAGGTCGACGCTTAAATCGGA
CTGGGCGTAAAGCGCACGAGCGGCTGTGCAAGTCGGATGTGAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTGCAAACTGGCAGGCTAGA
GCTTGTAGAGGGGGTGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATCGGTAGAGATCTGGAGGAATACCCGTGGCGAAGGCGGCGCCCTGGACAAA
GACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGTACCCTGGTAGTCCAGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTTCC
CTTGGAGGTTGGCTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATGACGGGGGCGC
GCACAAGCGGTGAGCATGTGGTTAATTCGATGCAACCGCAAGGTAATTAACCTTACGATCTTGCATCCAGAGAAGTACGAGAGATCTTGGT
CCTTCGGGAAGCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTGACGCTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTAT
TTGTTGCCAGCGCTTCGGCCGGGAAGCTCAAAGGAGACTGCCAGTGCATAAAGTGGAGAAAGTGGGGATGACGTAAGTCAATCATGGCCCTGA
CGAGTGGGCTACACAGTGTCAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCACAAAGTATGCTGTAGTCCGGA
TCGGAGTGTCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACAC
GCCGCTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTTCGG
>RS6
CCCCAAACAAAGGGGGGCGCCCTTTGGCCCTTCTCCCTTAACATGCCCCAGAGGGGTTAGTTTGGGGGGGGGGGAACCGCTCCCTGGGG
CCCATCGTAAGTGTGGGGGGGAGCCCGCCCGGGAATGAGCCCGTTCCAATTTTGGGGAGGcAGCAGTgGGGAATTTGCACAA
TGGCGCGAGGCTGACGCTGCCGCTGTATGAAGAAGGCTTCGGGTTGTAAGTACTTTACGCGGGGAGGAAGTGTGGTGGTTAATA

ACCGCAGCAATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAAT
TACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCTAG
AGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAA
AGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGC
CCTTGAGGCGTGGCTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAgTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTG
CCTTCGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCCTATCC
TTTGTGGCAGCGGTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAGTCATCATGGCCCTTA
CGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGAACTCGCGAGAGCAAGCGGACCTATAAAGTGCCTGATGTCGGGA
TTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACC
GCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACTTCGGGAGGGCGCTACCACTTGGATCAAAGG

>RS7

TGCAGTGAACGGCAGCGGGGGTAGCTTGTACTCTGCCGGCAGTGCGGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCTGTAGTGGGGAT
AACTAGTCGAAAGACTAGCTAATACCGCATACGACCTGAGGGTGAAAGTGGGGGACCGCAAGGCCCTCATGCTATAGGAGCGGCCGATGCTGA
TTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCCACCAAGCGCAGCATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAATTTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTT
GTAAAGCACTTTGTCCGGAAGAATCGCTTCGGTTAATACCTGGAGTGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGGACCGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCCGGTAATACGTAGGGTCCAAGCGTTAATCGGAATTAAGCGTGGCGTAAAGCGTGCCGAGGCGGTTGTGCAAGACCGATGTAATCCCC
GGCTTAACTGGGAATTGCATTGGTACTGCACAGCTAGAGTGTGTCAGAGGGAGGTAGAATCCACGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGAT
GTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCTCCTGGGATAACACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTG
TAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCATTTCCCTAGTAACGTAG



Anexo 2. Determinación de las sustituciones en las copias del gen ADNr 16S.

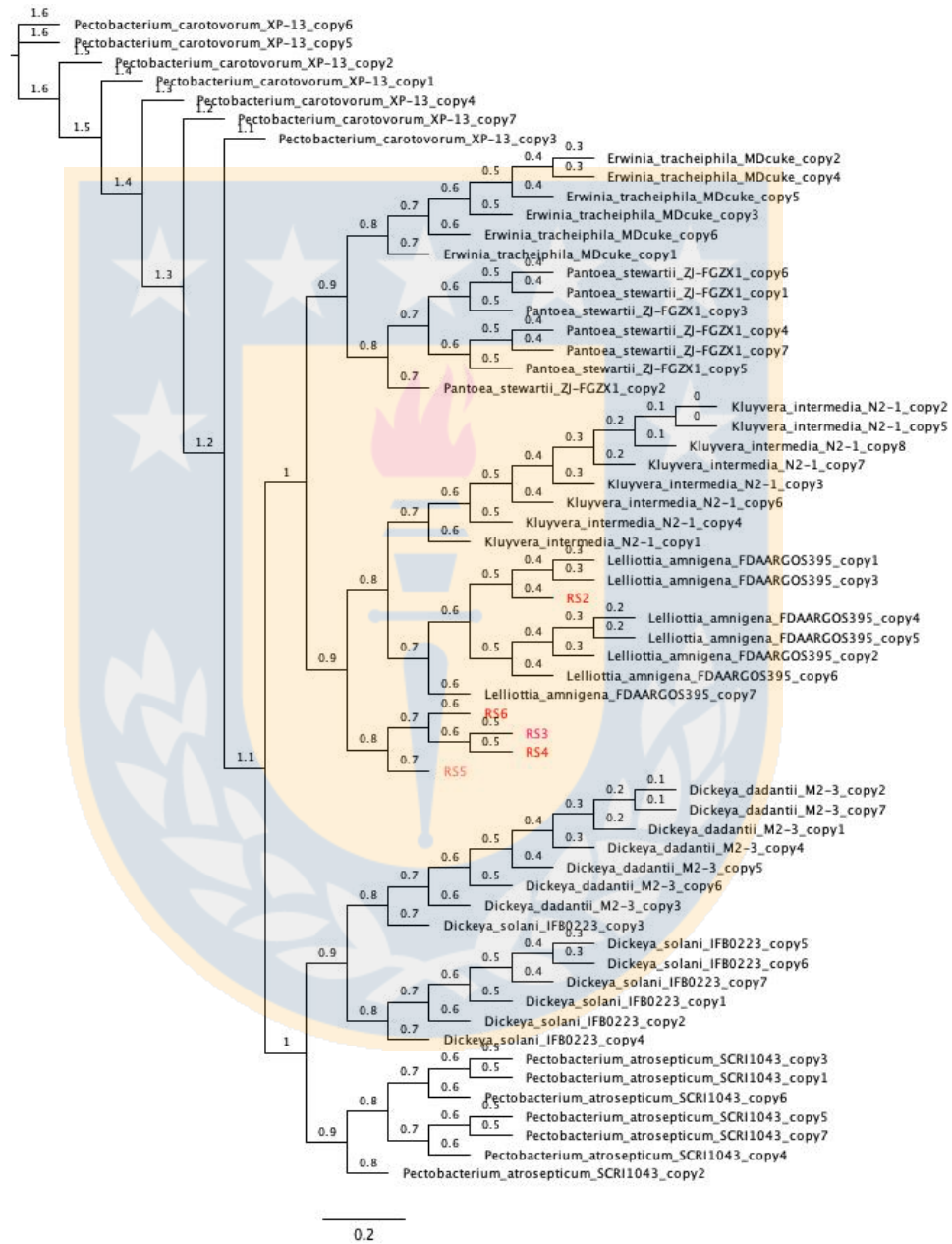
Reference Position <i>S. grimesii</i>									
	185	216	453	454	455	456	470	471	473
Serratia_grimesii_BXF1_Copy1	T	C	T	A	G	T	A	T	G
Serratia_grimesii_BXF1_Copy2	T	C	C	A	G	T	A	T	G
Serratia_liquefaciens_S1_copy1	A	T	T	A	G	T	A	T	G
Serratia_liquefaciens_S1_copy2	A	T	T	A	G	T	A	T	G
Serratia_liquefaciens_S1_copy3	T	T	T	A	G	T	A	T	G
Serratia_liquefaciens_S1_copy4	A	T	T	T	C	A	T	G	G
Serratia_liquefaciens_S1_copy5	A	T	T	A	G	T	A	T	G
Serratia_liquefaciens_S1_copy6	A	T	T	A	G	T	A	T	G
Serratia_liquefaciens_S1_copy7	A	T	T	A	G	T	A	T	G
C1	-	-	T	T	C	A	T	T	T
C2	T	C	T	T	C	A	T	T	G
C3	T	C	T	T	C	A	T	T	T
C4	-	-	T	T	C	A	T	T	T
C5	-	-	T	T	C	A	T	T	T

Reference Position <i>P. thivervalensis</i>		467	1026
Pseudomonas_thivervalensis_BS3779_copy1	T	A	
Pseudomonas_thivervalensis_BS3779_copy2	C	G	
Pseudomonas_thivervalensis_BS3779_copy3	T	A	
Pseudomonas_thivervalensis_BS3779_copy4	T	A	
Pseudomonas_thivervalensis_BS3779_copy5	C	G	
C6	T	A	
C7	T	A	

Reference Position <i>S. marscecens</i>								
	458	468	1006	1007	1016	1017	1242	1291
Serratia_marscecens_JW-C22_copy1	G	T	T	C	G	A	A	T
Serratia_marscecens_JW-C22_copy2	G	C	T	C	G	A	A	T
Serratia_marscecens_JW-C22_copy3	G	C	T	C	G	A	A	T
Serratia_marscecens_JW-C22_copy4	A	T	T	C	G	A	G	C
Serratia_marscecens_JW-C22_copy5	G	C	T	C	G	A	A	T
Serratia_marscecens_JW-C22_copy6	G	C	A	G	C	T	A	T
Serratia_marscecens_JW-C22_copy7	A	T	T	C	G	A	G	C
Serratia_marscecens_N4-5_copy1	G	C	T	C	G	A	A	T
Serratia_marscecens_N4-5_copy2	G	T	T	C	G	A	A	T
Serratia_marscecens_N4-5_copy3	T	T	T	C	G	A	A	T
Serratia_marscecens_N4-5_copy4	T	T	T	C	G	A	A	T
Serratia_marscecens_N4-5_copy5	G	T	T	C	G	A	A	T
Serratia_marscecens_N4-5_copy6	T	T	T	C	G	A	A	T
Serratia_marscecens_N4-5_copy7	G	T	T	C	G	A	A	T
RS1	G	T	T	C	G	A	A	T

Reference Position <i>L. amnigena</i>																
	486	835	845	1006	1007	1016	1017	1133	1241	1242	1259	1283	1289	1290	1305	1326
Lelliottia_amnigena_FDAARGOS395_copy1	T	T	A	A	G	C	T	T	A	T	C	C	A	T	C	G
Lelliottia_amnigena_FDAARGOS395_copy2	T	T	A	A	G	C	T	T	A	T	C	C	A	T	C	G
Lelliottia_amnigena_FDAARGOS395_copy3	T	T	A	A	G	C	T	T	A	T	C	C	A	T	C	G
Lelliottia_amnigena_FDAARGOS395_copy4	T	T	A	A	G	C	T	T	A	T	C	C	A	T	C	G
Lelliottia_amnigena_FDAARGOS395_copy5	T	T	A	A	G	C	T	T	A	T	C	C	A	T	C	G
Lelliottia_amnigena_FDAARGOS395_copy6	T	T	A	A	G	C	T	T	A	T	C	C	A	T	C	G
Lelliottia_amnigena_FDAARGOS395_copy7	T	T	A	A	G	C	T	T	A	T	C	C	A	T	C	G
RS2	T	T	A	A	G	C	T	T	A	T	C	C	A	T	C	G
RS3	T	T	A	A	G	C	T	T	A	T	C	C	A	T	C	G
RS4	T	T	A	A	G	C	T	T	A	T	C	C	A	T	C	G
RS5	T	T	A	A	G	C	T	T	A	T	C	C	A	T	C	G
RS6	C	G	C	T	C	G	A	C	G	C	A	T	G	C	T	A

Anexo 3. Árbol filogenético basada en la reconstrucción filogenética de Máxima Verosimilitud mostrando las relaciones de aislamientos identificados en co-cultivo con cepas responsables de marchitez bacteriana en otras especies y patógenos de papa.



Anexo 4. Información de la abundancia taxónomica e índices de riqueza y diversidad de las muestras de suelo y agua obtenidas con los análisis metagenómicos.

Item	Lecturas	Nº taxones	Taxón con asignación de nombre	% de taxones dominantes
ASVs	103710	2082	2082	2,98
Filo	103710	33	32	29,6
Clase	103710	90	71	15,7
Orden	103710	213	114	9,3
Familia	103710	340	277	6,6
Genero	103710	586	448	5,2
Especie	103710	708	285	3,1

Muestra	Riqueza	Shannon	Inv_Simp
Suelo_A	1127	6,14	154,98
Suelo_B	1044	5,96	124,60
Agua	544	5,00	67,16

