



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN  
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y ZOOTECNIA

**Caracterización de *Acidovorax avenae* en el  
agroecosistema caña de azúcar  
Estudios moleculares y análisis de secuencias  
relacionadas con la respuesta a estría roja en genotipos  
diferenciales**

**Ing. Agr. (MSc) Paola Daniela Fontana**

**Año 2018**

**-Tucumán, Argentina-**



Universidad Nacional de Tucumán  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA Y ZOOTECNIA**



## **Autoridades**

### **Decano**

Prof. Mag. Ing. Agr. Roberto D. Corbella

### **Vice Decana**

Prof. Mag. Ing. Agr. Miriam Rosana Paz

### **Secretaria Académica**

Prof. Mag. Ing. Agr. Olga M. Baino

### **Secretario de Asuntos Administrativos**

Cn. Luis María R. Geria Reines

### **Secretario de Posgrado e Investigación**

Dr. Ing. Zoot. Harold Vega Parry

### **Secretario de Gestión y Extensión**

Ing. Agr. Roque F. Budeguer



Universidad Nacional de Tucumán  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA Y ZOOTECNIA**



TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO  
SUPERIOR DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS TITULADO:

**Caracterización de *Acidovorax avenae* en el  
agroecosistema caña de azúcar.**

**Estudios moleculares y análisis de secuencias  
relacionadas con la respuesta a estría roja en genotipos  
diferenciales**

**Tesista**

Ing. Agr. (MSc) Paola Daniela Fontana

**Director**

Dr. Sergio M. Salazar

**Co-directora**

Dra. Graciela M. Vignolo

**Comisión de Supervisión**

Dr. Juan Carlos Díaz Ricci

Dr. Luis Ernesto Erazzú

## Agradecimientos

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), por el otorgamiento de los fondos para la realización de esta tesis Doctoral y por brindarme las herramientas e instrumentos necesarios para la realización del proyecto.

A la Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Agronomía y Zootecnia y Comité Académico del Doctorado en Ciencias Biológicas por admitirme para la realización del postgrado.

A mis Directores, Dr. Sergio M. Salazar y Dra. Graciela M. Vignolo y a los miembros de la Comisión de Supervisión, Dr. Juan Carlos Diaz Ricci y Dr. Luis E. Erazzu, por su acompañamiento, por sus consejos y orientación permanente.

A la Universidad Católica del Sacro Cuore, Cremona, Italia, y en particular al Dr. Pier Sandro Cocconcelli, por toda la colaboración brindada en estos años de trabajo, por poner a disposición todos los medios para la realización de mis experimentos.

Al Dr. Nicolás Tomasini, del Instituto de Patología Experimental, Universidad Nacional de Salta-CONICET, por su invaluable contribución para alcanzar los objetivos de esta tesis.

Al Dr. Luigi Orru' del Council for Agricultural Research and Economics (CREA) Fiorenzuola d'Arda PC, Italia, por su valiosa colaboración en los análisis bioinformáticos.

A todos mis compañeros del grupo Caña de Azúcar de la EEA INTA Famaillá, por su apoyo y los buenos consejos para concretar este trabajo.

A los amigos y compañeros, colegas y colaboradores, por estar siempre presentes, aconsejando, escuchando y discutiendo para enriquecer el trabajo.

A mi madre en especial porque en ella siempre vi un ejemplo de superación, de valor y dedicación aún en los momentos muy difíciles.

A mis hermanos, Cecilia y Baltazar, amigos y compañeros incondicionales, siempre presentes ayudándome cada uno desde su lugar, con amor y paciencia.

A mis hijos, Marcos y Luciano, que son la motivación más importante, la fuerza y la alegría de mi vida, gracias mis soles por tanta luz y amor inmenso.

A Mariano Garmendia mi compañero de vida... por no dejarme bajar los brazos y sostenerme en cada momento, por todo el amor y la comprensión.

A Dios... por contar con todo lo mencionado anteriormente y por iluminar y fortalecer mi vida cada día.

*A mi familia...*

## -RESUMEN-

En Argentina, la actividad cañera está concentrada en la región noroeste (98%), y representa la segunda actividad económica y social más importante, influyendo en la historia política y económica de toda la región. La actividad demanda una constante investigación y experimentación, para dar respuesta a las principales problemáticas que afectan al desarrollo del cultivo. En particular, cuando se habla de procesos infecciosos en las plantas se concentra toda la atención en el binomio planta-agente causal, dejando de lado una serie de conceptos indispensables para comprender el patosistema como algo integral. En el caso de la estría roja, una enfermedad causada por una bacteria denominada *Acidovorax avenae*, que afecta las principales regiones cañeras del mundo, mostró en nuestro país, durante los últimos diez años, un marcado aumento en su incidencia y severidad en lotes comerciales, probablemente favorecida por la cosecha en verde y la rotación con soja como prácticas agronómicas más frecuentes. El objetivo de este trabajo de tesis Doctoral fue establecer las características del patógeno mediante la secuencia de genes específicos y explorar, con un enfoque de interacción suelo-planta, las relaciones entre la microbiota principal acompañante en un sistema de manejo de caña con rotación con soja, y el desarrollo de la enfermedad. Para ello, se llevó a cabo el aislamiento y caracterización microbiológica clásica, y posteriormente el estudio de la diversidad genética, de las cepas de *A. avenae* aisladas de las regiones NEA y NOA se realizó mediante RAPD-PCR y MLST. Se determinó la presencia de cinco genotipos multilocus, muy emparentadas entre sí que forman un complejo clonal único y derivan de un origen común y cercano. Una alta especificidad cepa-hospedante fue demostrada en base a la marcada separación de las cepas de *A. avenae* de caña de azúcar del resto de las especies de *Acidovorax*. Como modelo de estudio, se describió además en este trabajo la secuenciación del genoma de *A. avenae* T10\_61 aislada en Tucumán. Métodos independientes de cultivo, DGGE y Metagenómica ayudaron a estimar la composición microbiana, presente en hojas y suelo de caña de azúcar. El enfoque de secuenciación de alto rendimiento (HTS) de metagenómica, arrojó una gran cantidad de información de Unidades taxonómicas (OTUs) siendo los órdenes más abundantes *Bacillales*, *Rhizobiales*, *Rhodospirilliales*, *Xanthomonadales*, *Acidobacteriales*, *Sphingomonadales*. Los datos obtenidos aportan valiosa información para profundizar en el conocimiento y estudio del patosistema caña de azúcar-*A. avenae*.

Índice	Pag.
<b>Capítulo I</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
I.1. La caña de azúcar	2
I.1.1. Características de la especie	2
I.2. La agroindustria azucarera. Su importancia en el mundo y en la región	3
I.2.1. Principales productos y subproductos	5
I.2.2. Caña de Azúcar en Tucumán	6
I.2.3. El sistema productivo en Salta y Jujuy	9
I.2.4. La situación actual del cultivo en el Noreste Argentino (NEA)	10
I.2.5. Factores limitantes en el cultivo de caña de azúcar.	11
I.3. Estría roja	13
I.3.1. Agente etiológico y antecedentes de la enfermedad	13
I.3.2. El patosistema caña de azúcar- <i>Acidovorax avenae</i>	15
I.4. Implementación de métodos moleculares en la tipificación de fitopatógenos	17
I.4.1. MLST “Multilocus Sequence Typing”	20
I.5. Estudio de las comunidades microbianas en el agroecosistema caña de azúcar mediante técnicas directas	21
I.5.1 La importancia de la Biodiversidad en los ecosistemas agrícolas	21
I.5.1.1. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)	23
I.5.1.2. Metagenómica	24
I.6. Hipótesis y Objetivos	26

<b>Capítulo II</b>	28
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
II.1. Aislamiento y Caracterización de <i>Acidovorax avenae</i>	29
II.1.1. Muestreo de plantas	29
II.1.2. Aislamientos e identificación de <i>Acidovorax avenae</i>	31
II.1.2.1. Medios de cultivo	31
Componentes, esterilización y determinación de pH	
II.1.2.2. Conservación de las cepas	33
II.1.2.3. Pruebas fenotípicas para la identificación de los aislamientos	33
II.1.2.4. Identificación taxonómica de los aislamientos por técnicas moleculares	34
II.1.2.4.1. Tampones y soluciones	34
II.1.2.4.2. Obtención de ADN cromosómico a partir de cultivos puros	35
II.1.2.4.3. Identificación de <i>A. avenae</i> mediante PCR	37
II.1.2.4.4. Condiciones de amplificación y electroforesis	38
II.1.2.4.5. Preparación de los fragmentos amplificados para reacciones de secuenciación	39
II.1.3. Tipificación genética de cepas de <i>A. avenae</i>	40
II.1.3.1. RAPD “Random Amplified Polymorphic DNA” (amplificación polimórfica del ADN al Azar)	40
II.1.3.2. Análisis MLST “Multilocus sequence typing” (tipificación de secuencia multilocus).	42
II.1.3.2.1. Amplificación por PCR y secuenciación.	42
II.1.3.2.2. Análisis de datos MLST	47
II.1.4. Secuenciación de genoma de <i>A. avenae</i> T10_61	48
II.1.4.1. Estudios genómicos comparativos	49

II.1.5. Ensayos de Virulencia.	51
II.2. Caracterización de la microbiota principal en el patosistema en estudio.	54
II.2.1. Muestreo	54
II.2.2. Extracción de ADN Total	55
II.2.3. Electroforesis con gradientes desnaturalizantes químicos DGGE	57
II.2.3.1 Optimización del protocolo de DGGE	60
II.2.4. Análisis Metagenómico	61
II.2.4.1. Secuenciación de alto rendimiento (HTS) de amplicones de rRNA 16S	61
II.2.4.2. Procesamiento de los datos de secuencia y análisis	63
<b>Capítulo III</b>	64
<b>RESULTADOS</b>	
III.1. Aislamiento e identificación de <i>Acidovorax avenae</i>	65
III.2. Caracterización molecular	68
III.2.1. Extracción de ADN bacteriano.	68
III.2.2. Identificación de <i>A. avenae</i> mediante PCR especie –específica	68
III.3. Diversidad genética de <i>A. avenae</i>	70
III.3.1. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	70
III.3.2. MLST “Multilocus sequence typing”	73
III.3.2.1. Amplificación y determinación de la secuencia de genes para MLST	73
III.3.2.2. Perfiles Alélicos y “Sequence Type” (ST) o Genotipos multilocus.	73
III.3.2.3. Complejos clonales en <i>Acidovorax sp.</i>	76

III.3.2.4. Recombinaciones genéticas en <i>Acidovorax sp.</i>	77
III.4. El Genoma de <i>A. avenae</i> T10_61	85
III.4.1. Análisis comparativo de genomas de <i>Acidovorax sp.</i>	85
III.5. Niveles de virulencia de las cepas de <i>Acidovorax avenae</i> evaluadas	89
III.6. Estudio de comunidades microbianas y su interacción con el patosistema <i>Acidovorax</i> - caña de azúcar.	91
III.6.1. Análisis mediante DGGE	91
III.6.2. Estructura y composición de la microbiota del suelo en el patosistema “caña azúcar- <i>Acidovorax</i> ”	95
III.6.2.1. Análisis de diversidad “Alpha”.	95
III.6.2.2. Análisis de OTUs	98
III.6.2.3. Diversidad “beta”	102
III.6.2.3.1. Análisis Comparativos de la composición microbiana	103
Capítulo IV DISCUSIÓN	112
Capítulo V CONCLUSIONES	127
BIBLIOGRAFÍA	131
Proyecciones	146
Índice de Tablas	147
Índice de Figuras	149
Índice de Publicaciones	153
Abreviaturas	154
Anexo I	157
Anexo II	159

**Capítulo I**

---

**Introducción**

---

## **I.1. La caña de azúcar**

### **I.1.1. Características de la especie**

La caña de azúcar, *Saccharum officinarum* (L.) constituye el cultivo sacarífero más importante del mundo, responsable de más del 70% de la producción total de azúcar. Originario de Nueva Guinea, sudeste de Asia, donde se cultiva desde épocas remotas, este cultivo se extiende actualmente a lo largo de los trópicos y subtrópicos, entre los 36, 5° de latitud norte, hasta los 31° de latitud sur. (Romero et al., 2009). Pertenece a la familia *Poaceae*, tribu *Andropogonaceae*. Las variedades actualmente cultivadas son el resultado de hibridaciones interespecíficas que involucran a las especies *S. officinarum*, *S. spontaneum*, y *S. robustum* entre otras (Nóbrega y Dornelas, 2006). Actualmente se encuentra distribuida en extensas áreas, presentando un mejor comportamiento en regiones tropicales debido a la ocurrencia de dos estaciones diferentes: una caliente y húmeda para una mejor germinación y otra más fría y seca para favorecer la maduración y acumulación de sacarosa (Alvarez et al., 1995). La importancia de este cultivo puede ser atribuida a su múltiple utilización, siendo principalmente empleada como materia prima para la producción de azúcar y alcohol, y más recientemente como un cultivo energético, a través de la utilización de la biomasa y de los residuos agrícola de cosecha (RAC).

La caña de azúcar es una planta plurianual cuya renovación en plantaciones comerciales se produce alrededor de los cinco años de implantada, siendo este lapso mayor o menor según el nivel de rendimiento que presente el cañaveral. Crece formando matas constituidas por varios tallos macizos sin ramificar y con un sistema subterráneo formado por raíces y rizomas (Mozambani et al., 2006). El tallo es el órgano que interesa desde el punto de vista de la producción de azúcar, ya que en él se almacena la sacarosa que constituye alrededor del 12% del peso fresco del mismo. Los tallos poseen entre 20 y 25 entrenudos o “canutos”, de color, diámetro y longitud variables según las condiciones de crecimiento y las características varietales. Sus hojas se originan en los nudos y están constituidas por la vaina que envuelve al tallo y la lámina que tiene una longitud de aproximadamente 1 m y un ancho de 5 a 7 cm (Nóbrega

y Dornelas, 2006). La caña de azúcar se propaga asexualmente partiendo de brotaciones de las yemas que contiene el tallo, denominándose "caña semilla" al trozo de tallo que se coloca en el surco de plantación. La brotación inicial origina un tallo primario, de las yemas basales de éste salen los tallos secundarios y de sus yemas los tallos terciarios, conformando en su conjunto el "macollaje" de la caña (Mozambani et al., 2006).

## **I.2. La agroindustria azucarera. Su importancia en el mundo y en la región.**

La producción mundial de azúcar en la campaña 2016/17 fue de alrededor de 170 millones de toneladas siendo el 80% de este azúcar proveniente del cultivo de caña de azúcar. Brasil lidera la producción de azúcar (seguido de India y la UE) y la exportación, ya que genera 37 millones de tn/año y exporta cerca de 26 millones a partir de una producción aproximada de 739.300 toneladas métricas caña de azúcar por año. Le siguen India, China, y Tailandia entre los principales países productores de caña de azúcar del mundo (<http://www.fas.usda.gov/commodities/sugar>).

El consumo mundial en 2016/17 alcanzó un récord de 174 millones de toneladas métricas (valor en bruto), excediendo la producción y reduciendo las existencias al nivel más bajo desde 2010/11. Si bien en el mundo el consumo creció de manera sostenida y paralela con la producción, en los últimos dos años la tasa de incremento de la producción disminuyó mientras que el consumo continuó en aumento. El promedio mundial de consumo, se ubica en 21,6 kg/hab/año, pero presenta como casos extremos a Cuba, con más de 60 kg/hab/año, y China con 7,5 kg/hab/año (Ríos, 2008).

En Argentina, la superficie de producción de caña de azúcar es de 365.000 has, concentradas en la región noroeste (98%), donde representa la segunda actividad económica y social más importante (Wallberg y Minetti, 2015). El sector genera unos 45 mil puestos de trabajo directos e ingresos por \$8.000 millones anuales y, de acuerdo con estimaciones del INTA, crecería un 33% hasta el 2020 (<http://intainforma.inta.gov.ar/?p=17968#sthash.WrqqxqbE.dpuf>). En las últimas tres campañas, el sector alcanzó una producción promedio de 2,1

millones de toneladas de azúcar, con una molienda de 20 millones de toneladas de caña de las cuales 3,2 millones de toneladas podrían usarse directamente para la producción de bioetanol para cumplir con el mandato local sobre biocombustibles con cerca de 380 millones de litros de alcohol (<http://centroazucarero.com.ar/oldsite/zafas/zafra2016.html>, Centro Azucarero Argentino).

Tucumán es el principal productor de caña de azúcar de Argentina, con un 68% del total nacional (Perez et al., 2007).

El principal destino de la producción de azúcar es el mercado interno que absorbe 1,45 millones de tn (91%), representando un consumo por habitante de 38 kg/año, similar al de países desarrollados (EE.UU. y UE), aunque marcadamente inferior al de otros países productores en la región como Brasil (59 kg/hab/año). Aproximadamente el 60% del consumo nacional es industrial (gaseosas, dulces, golosinas, etc.), mientras que el 40% restante se consume de manera directa. Los excedentes de producción y los stocks acumulados resultan ser fuertemente determinantes de los precios internos del producto. En el año 2016 se exportaron más de 580 mil tn de azúcar, crudo y blanco (cerca de 400 mil tn más respecto del 2015 (Centro Azucarero Argentino, 2016).

Como consecuencia de la alta sensibilidad y vulnerabilidad de los mercados, el sector agroindustrial azucarero debió atravesar frecuentes períodos críticos determinados por altas producciones, bajos precios internos, desorden del mercado nacional y una fuerte reticencia de base especulativa para exportar equitativamente los excedentes a menores precios. A esto debe agregarse una significativa presión y latente potencial amenaza derivada de varios intentos para flexibilizar la comercialización del azúcar en el ámbito del MERCOSUR, desfavorable para la agroindustria nacional en razón del marco de fuertes asimetrías entre las producciones de Argentina y Brasil. El azúcar hasta ahora se ha excluido de la nómina de productos de libre comercialización en los países del MERCOSUR lo que se fundamentó en los subsidios indirectos que benefician a la agroindustria de la caña de azúcar en Brasil (Mariotti, 2008).

La actividad agroindustrial azucarera, constituye el 1,5% del PBI agropecuario nacional, pero con fuerte representación en los PBI agropecuarios de las provincias de la región (58,5% en Jujuy, 50% en Tucumán, 25,6% en Salta) (Ríos y Delgado Cordomi, 2008). Tiene además un fuerte impacto y repercusión social, siendo fuertemente generadora de una importante demanda laboral indirecta. Se estima que, por cada posición de ocupación directa por la agroindustria azucarera, se generan cinco posiciones de ocupación laboral indirecta, principalmente a través de los servicios requeridos. Es una de las actividades más importantes del sector agrícola e industrial de las regiones productoras, representando en la mayor parte de ellas niveles de importancia social, cultural, política y económica de especial relevancia siendo un sector determinante para el desarrollo agroempresarial (Mariotti, 2008).

Desde la selección misma de los terrenos más apropiados, la optimización de materiales vegetales, aplicación de técnicas de manejo cultural eficientes y sostenibles, los servicios de cosecha e industrialización de la materia prima, pasando por el uso adecuado de los recursos naturales en concordancia con la conservación del medio ambiente y todas las relaciones políticas y económicas alrededor de la comercialización local, regional y mundial, definen una red de factores que involucran vastos sectores de población afectada directa o indirectamente por las decisiones y orientaciones que se tomen en cada uno de los eslabones que forman la cadena de valor de la caña de azúcar (Ferrari y Macera., 2008).

### **I.2.1. Principales productos y subproductos**

El azúcar es el principal producto de la cadena, mostrando la dependencia que el sector tiene con este elemento (Fig.1.1). El alcohol es el derivado más importante después del azúcar, con excepción de Brasil donde es el destino principal ya que 55% de la caña cultivada se destina a la producción de etanol (USDA, 2018), aunque en la actualidad este producto tiene una importancia creciente en gran parte de los países productores.

Los subproductos de la transformación, más importantes, son:

**Melaza:** se usa para la elaboración de alcohol y como alimento para el ganado. Se pueden obtener entre 11 y 32 L/tn de caña.

**Cachaza:** se obtiene de la extracción y filtración del jugo. Se obtienen 0,04 tn/tn de caña molida.

**Bagazo:** se clasifica en meollo y fibra. se usa en la fabricación de pulpa de papel, tableros aglomerados y generación de energía eléctrica.

**Vinaza:** La producción de bioetanol a partir de la caña de azúcar genera vinaza, un efluente con altos contenidos en materia orgánica y sales como potasio, principalmente.

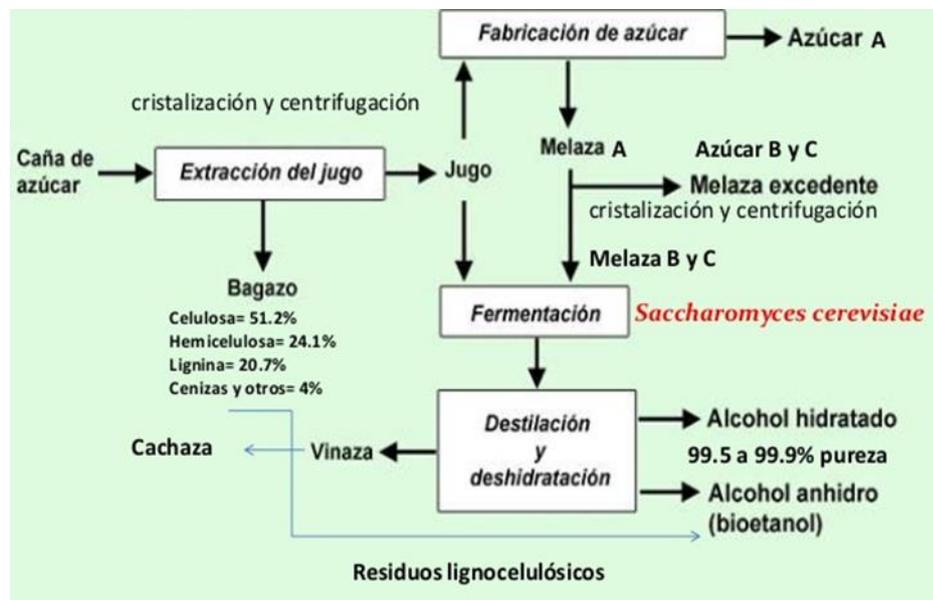


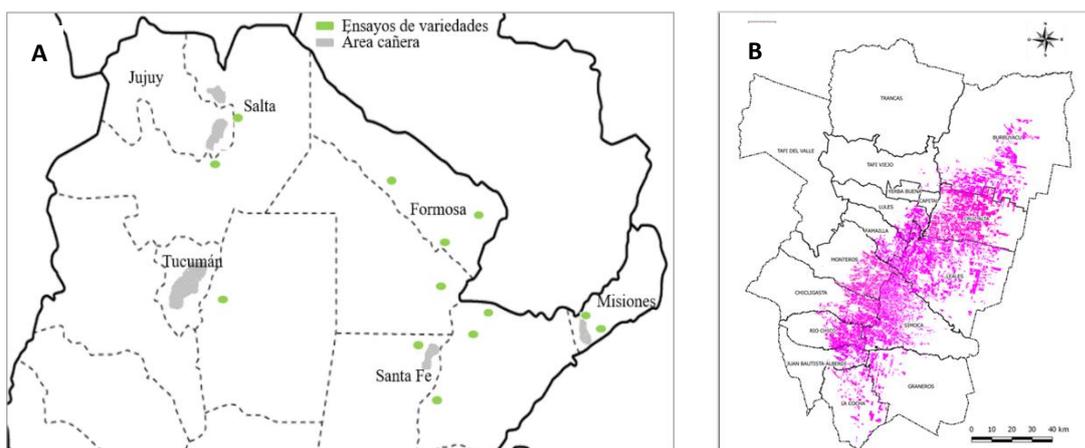
Fig. 1.1 Esquema del proceso típico de fabricación de azúcar y alcohol.

### I.2.2. Caña de Azúcar en Tucumán

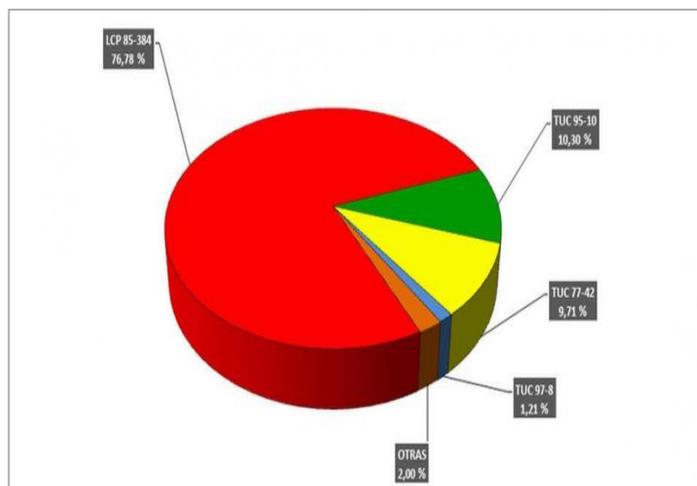
En Argentina la caña de azúcar se cultiva en las provincias de Tucumán, Jujuy, Salta, Santa Fe y Misiones, siendo la provincia de Tucumán la principal productora (Fig.1.2 A). La producción de azúcar en Tucumán durante las últimas tres campañas fue de aproximadamente 1.400.000 tn. Históricamente, la superficie implantada en la provincia, se mantuvo entre 225.000 y 250.000 ha, con ciertas fluctuaciones, representando cerca del 50% de la superficie cultivable provincial (Romero et al., 2009). El Laboratorio de Sistemas de Información Territorial del INTA EEA Famaillá determinó que la superficie a cosechar con caña de azúcar durante la zafra 2018 es de 273.737 ha, a partir del procesamiento

de imágenes satelitales provistas por la Comisión Nacional de Actividades Espaciales de Argentina (CONAE). La cartografía digital obtenida (Fig.1.2 B) permitió observar la distribución del cultivo en la provincia a nivel departamental. La expansión territorial del cultivo se encuentra limitada al norte y al oeste por el relieve serrano; al este y al sur por la disminución de las precipitaciones (isoyeta de 700 mm), el aumento del número de días con heladas y la presencia de suelos salinos. La superficie cultivada se circunscribe a las regiones agroecológicas del Pedemonte, donde compite con cultivos cítricos y hortícolas, y de las Llanuras Deprimida y Chacopampeana (Sanzano y Fadda, 2009). La producción de la caña de azúcar se basa en el cultivo de distintas variedades que se distribuyen en la provincia según su adaptación a las diferentes regiones agroecológicas. Para la campaña 2016/2017 la distribución porcentual de las principales variedades cultivadas en las distintas zonas cañeras de Tucumán se presenta en la Figura 1.3, donde se observa que LCP 85-384 es la variedad más cultivada ocupando más del 75% del cañaveral. siendo necesaria una distribución varietal más equilibrada para favorecer la sustentabilidad del agroecosistema.

<https://www.lagaceta.com.ar/nota/768887/actualidad/apuestan-area-canera-tucuman-se-convierta-ecosistema-mas-sustentable.html>



**Fig. 1.2.** A. Áreas productoras de caña de azúcar en Argentina y distribución de ensayos de variedades de INTA. B. Superficie plantada con caña de azúcar en la provincia de Tucumán (2018). Fuente: Laboratorio de Sistemas de Información Territorial del INTA EEA Famaillá.



**Fig. 1.3** Distribución porcentual de la superficie ocupada por las variedades cultivadas en la provincia de Tucumán según relevamiento campaña 2016/2017.

Los suelos en el área de cultivo en general poseen buen drenaje con excepción de los localizados en la Llanura Deprimida, donde son afectados por fenómenos de revenimiento (ascenso de niveles freáticos y salinización de niveles edáficos). El terreno presenta una pendiente general suave hacia el sudeste y su topografía no presenta mayores impedimentos para la mecanización del cultivo (Sanzano y Fadda, 2009).

La producción industrial de azúcar tiene en la provincia de Tucumán más de 200 años, con una significativa influencia en la historia política, económica y social, contribuyendo con el 38% al Valor Agregado Industrial de la Provincia ([http://estadistica.tucuman.gov.ar/sector\\_agropecuario](http://estadistica.tucuman.gov.ar/sector_agropecuario) 2013). Esta actividad, produce en quince ingenios localizados en la provincia, las 2/3 partes del azúcar argentino. El cultivo más la actividad industrial de los ingenios, emplean aproximadamente 25.000 personas por año, destacándose, además, la presencia de pequeños y medianos productores, que representan al 70% del total, obtienen su sustento gracias a este cultivo. Por otro lado, el efecto multiplicador por cada peso que se genera en la producción de caña, se generan 7 pesos en la economía circundante (Mariotti, 2008).

El sector agropecuario tucumano es impensable sin la actividad azucarera determinando la importancia y necesidad de llevar a cabo una intensa actividad de investigación y experimentación, tendiente a lograr en el mediano plazo,

condiciones de productividad competitiva. En consecuencia, es necesario destinar recursos de investigación y transferencia tecnológica para la obtención de variedades de caña de azúcar genéticamente mejoradas, que evidencien una elevada tolerancia a diversos factores bióticos y abióticos que inciden sobre la producción.

### **I.2.3. El sistema productivo en Salta y Jujuy**

El sector azucarero de las provincias de Salta y Jujuy posee una estructura muy diferente a la de Tucumán. La principal diferencia es el mayor tamaño de las explotaciones, puesto que el 85% de la caña es propiedad de cinco ingenios. Esta situación favorece un mejor manejo de la cosecha, que se suma a importantes inversiones en genética y a maquinarias más avanzadas, factores derivados de la mayor disponibilidad de capital que tienen estas firmas con respecto a los cañeros independientes. Sin registrar marcas tan espectaculares como Tucumán, las provincias de Salta y Jujuy también tuvieron incrementos productivos importantes. La producción de las últimas tres campañas, se mantuvo alrededor de las 640.000 tn en 2016, con pequeñas variaciones interanuales, pero con una marcada tendencia en alza debido a que alcanzaron rendimientos fabriles promedio de 11,6% de azúcar sobre peso de caña, 6% más que en 1990 y 2,2% superior a la marca de 2004 (Ferrari y Macera, 2008). Los rendimientos culturales promedio de los ingenios norteños son notablemente superiores a los que obtienen en las mismas provincias los cañeros independientes. Según estimaciones del INTA, los rindes de los cañaverales de los ingenios alcanzan las 93,5 tn/ha, frente a los 75,4 de los independientes (Ferrari y Macera, 2008). Las variedades más utilizadas en la región son: TucCP 77-42, CP 70-1133, NA 90-1001, NA 96-2929, NA 97-3152, LCP 85-384, que representan prácticamente el 85% del cañaveral en Ledesma (Jujuy), mientras que en el Ingenio Tabacal (Salta) las variedades más difundidas son: NA 97-3152, LCP 85-384, NA 90-1001, INTA NA 89-686, NA 96-2929 y TucCP 77-42 ocupando cerca del 80% del área plantada (Fuente: Dpto. Técnico Ledesma y Tabacal respectivamente).

La mecanización de la cosecha está generalizada en toda la región. La mayoría de los ingenios aplican un sistema de mecanización integral, en tanto que 40% de los cañeros independientes cuentan con mecanización completa y el 60% restante aplica el sistema semi-mecanizado (Volante et al., 2004). Como las lluvias son menores a las requeridas para el adecuado rendimiento de la caña, la utilización del riego es necesaria. Los ingenios aplican tecnologías de avanzada que permiten un aprovechamiento racional del agua, en tanto que los restantes productores poseen sistemas menos eficientes (Volante et al., 2004).

#### **I.2.4. Situación actual del cultivo en el Noreste Argentino (NEA)**

En Argentina la producción se concentra principalmente en cinco provincias. Tucumán, Salta y Jujuy, representan más del 90% de la misma, y el resto Misiones y Santa Fe. En estas provincias históricamente subsisten pequeñas explotaciones que utilizan la caña en productos artesanales y como forraje. Actualmente, el esquema productivo de la actividad cañera en Argentina tiene como objetivo no sólo la producción de azúcar, sino también de bioetanol. Esto generó la demanda de varias provincias ante las posibilidades de cultivar caña en ambientes no tradicionales y aptos desde el punto de vista agroecológico, económico y ambiental. En ese contexto, desde el año 2012, el INTA Famaillá conduce la Red de Evaluación de Cultivares de Caña de Azúcar (Red Caña) con el objetivo de generar información para estas nuevas áreas, que incluyen aspectos de adaptabilidad, estabilidad productiva y riesgos potenciales derivados del estrés ambiental ante la posibilidad de implantar el cultivo. En este esquema, además de Santa Fe y Misiones se suman Corrientes, Chaco y Formosa que muestran condiciones agroecológicas aceptables (requisitos de temperatura y agua) para la implementación del cultivo.

A diferencia de Tucumán y el norte (Salta y Jujuy), el modelo de producción de caña de azúcar en el NEA incluye a productores de pequeña escala. La variedad más difundida es la TucCP 77-42 en Misiones y NA 85-1602 en Santa Fe. Actualmente, el cultivo de caña de azúcar es impulsado no solamente para la producción de azúcar propiamente dicha, sino también para la

producción de bioenergía, ya sea mediante la elaboración de alcohol como así también por el aprovechamiento del bagazo (residuo de la caña) para la generación de electricidad. El alcohol es utilizado para ser mezclado con las naftas y el bagazo se emplea de diversas maneras para generar electricidad. La caña de azúcar también puede ser utilizada como forraje, (mayormente en Misiones). La vinaza, que es el efluente que produce la destilación de alcohol, es otra alternativa de uso en riego como fertilizante rico en potasio

### **I.2.5. Factores limitantes en el cultivo de caña de azúcar**

El crecimiento y desarrollo del cultivo de la caña de azúcar, pueden verse afectados por una serie de factores internos y externos que condicionan la producción de caña y el rendimiento, incidiendo sobre el resultado productivo. Entre estos factores externos, los fitosanitarios ocupan un lugar importante, siendo las enfermedades una limitante en la productividad del cultivo. Más de cien enfermedades fueron descritas en caña de azúcar (Rott y Davis, 2000) que involucran diversos tipos de microorganismos patógenos, como virus, hongos y bacterias, que ocasionan distintas lesiones o generan impedimentos afectando el desarrollo del cultivo y reduciendo considerablemente la cantidad y/o calidad del producto. Al menos diez de estas enfermedades son consideradas de gran significancia ya sea por su importancia actual o potencial, según sea que causen un perjuicio directo o que constituyan una amenaza futura, respectivamente (Maccheroni y Matsuoka, 2006).

En nuestro país existen antecedentes que confirman la importancia de las enfermedades en el cultivo de la caña de azúcar. Así se pueden mencionar, las “crisis del mosaico” en el año 1920 y “del carbón” en 1940, que pusieron en riesgo a toda la agroindustria azucarera argentina, debido a la elevada susceptibilidad de las variedades que se cultivaban en esos años. Las enfermedades en la caña de azúcar no solo influyen sobre la producción y la calidad fabril, sino además causan la pérdida de las variedades en cultivo obligando a sustituirlas periódicamente. De igual manera, afectan a materiales que se encuentran en

proceso de selección, eliminando clones avanzados, que evidencian un quiebre en su resistencia.

Algunos patógenos varían su capacidad para producir enfermedad, adaptándose a condiciones particulares del cultivo, como pueden ser la introducción de nuevas variedades o de nuevas prácticas de manejo. Estos factores generan un sistema dinámico, donde la correcta identificación de los agentes causales de las enfermedades es fundamental para conocer el comportamiento del cultivo frente a los patógenos más comunes (Rago, 2003).

El manejo integral de estas enfermedades se basa principalmente en la resistencia genética de las variedades, el control biológico, el uso de semilla sana y la ejecución de prácticas culturales durante el establecimiento y el desarrollo del cultivo. Para ello es necesario conducir estudios etiológicos como también epidemiológicos de las enfermedades, desarrollando métodos de identificación y caracterización de los microorganismos responsables en cada patosistema en particular.

En la región cañera Argentina, los agentes responsables de las principales enfermedades son hongos, bacterias y virus, pudiendo mencionarse a modo de ejemplo algunas enfermedades causadas por estos agentes en todas las regiones cañeras del mundo: roya, marrón y anaranjada y carbón, causadas por los hongos *Puccinia melanocephala*, *P. kuehnii*, y *Sporisorium scitamineum*, respectivamente, virus del mosaico SCMV "Sugarcane mosaic virus" y del amarillamiento SYLV "Sugarcane Yellow leaf virus" y bacteriosis principalmente raquitismo de las socas (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*), escaldadura de las hojas (*Xanthomonas albilineans*) y estría roja (*Acidovorax avenae*) (Rott y Davis, 2000).

De las enfermedades bacterianas, la estría roja, se encuentra entre las de mayor importancia para el cultivo. Los programas de mejoramiento genético en el país le asignan a esta enfermedad un mayor nivel de importancia ante el cambio relativo de preponderancia respecto de otras. Actualmente se valora con más atención el grado de resistencia de los clones promisorios, en especial en las etapas finales del programa y en distintos ambientes agroecológicos, en base a su respuesta a estría roja.

### I.3. Estría roja

#### I.3.1. Agente etiológico y antecedentes de la enfermedad

La estría roja es una enfermedad bacteriana de la caña de azúcar cuyo agente causal es *Acidovorax avenae* (Manns, 1909; Willems et al., 1992; Schaad et al., 2008). Es una bacteria de origen asiático distribuida en las principales regiones cañeras del mundo. La estría roja fue reportada por primera vez en 1922 por Lyon, en Hawái, como una enfermedad de las hojas de caña de azúcar conocida también como “podredumbre del cogollo o del brote terminal” (Edgerton, 1959). Sus síntomas, como estrías rojas finas con longitud de cinco a 60 cm de largo o pudrición del ápice de la planta, pueden evidenciarse juntos o aislados (Rott y Davis, 2000). En las hojas, los primeros síntomas son estrías acuosas que gradualmente toman la coloración rojiza. En las lesiones nuevas es común observar exudados de la bacteria. Posteriormente los síntomas se extienden hacia el meristema apical que se vuelve húmedo como consecuencia de la muerte de los tejidos, causando podredumbre del brote. En condiciones, favorables, la podredumbre del brote se extiende por todo el tallo causando grietas por donde escurre líquido de olor intenso. Esta podredumbre puede alcanzar los nudos basales en variedades altamente susceptibles. Cañaverales así afectados generan un olor característico perceptible a varios metros de distancia (Maccheroni y Matsuoka, 2006).

Lee et al. (1925) demostraron que la estría roja estaba causada por una bacteria. En Australia, Cottrell-Dormer (1926, 1932) demostró que la misma bacteria causaba tanto la estría roja como la pudrición del cogollo de la caña de azúcar.

En nuestro país, Spegazzini (1895) la describió por primera vez como “gangrena húmeda” o “polvillo” y determinó en sus trabajos de aislamiento como agente causal a una bacteria que denominó *Bacillus sacchari*. Luego en 1922, Fawcett, en base a aislamientos sugirió también que se trataba de una bacteria. Posteriormente este microorganismo fue clasificado como *Xanthomonas rubrilineans* (Lee et al., 1925), mientras que Hayward (1962), en base a investigaciones sistemáticas de bacterias patógenas que afectan la caña de azúcar,

propuso el nombre *Pseudomonas rubrilineans* para reemplazar a *Xanthomonas rubrilineans*.

En Tucumán, Ramallo (1970), aisló la bacteria a partir de hojas infectadas de caña de azúcar que exhibían síntomas típicos de estría roja.

Hu *et al.*, en 1991, la reclasificó en base a análisis numéricos y genómicos como *Pseudomonas avenae* en referencia a la bacteria causal de “leaf blight” descrita por primera vez en avena por Manns (1909). Posteriormente, el grupo de *Pseudomonas* no fluorescentes, incluyendo *P. avenae* (Manns, 1909), *P. cattleyae* (Savulescu, 1947), *P. pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* (Schaad *et al.*, 1978) y *P. rubrilineans* (Lee *et al.*, 1925) fueron reubicados en el grupo de las nuevas “*Acidovorans*” como *A. avenae* subsp *avenae*, *A. avenae* subsp *cattleyae* y *A. avenae* subsp *citrulli*, respectivamente, en base a resultados de hibridaciones DNA-DNA, DNA-rRNA, electroforesis de proteínas y análisis numérico de test de asimilación de carbón (Willems *et al.*, 1992).

Las especies fitopatógenos de *Acidovorax* causan enfermedades en una amplia gama de cultivos de importancia económica, tanto monocotiledóneos (sandía, melón, orquídeas) y dicotiledóneos (maíz, arroz, avena, caña de azúcar) (Song *et al.*, 2004).

Schaad *et al.* (2008) propuso elevar a nivel de especie las *Acidovorax* fitopatógenas como *A. avenae*, *A. cattleyae*, *A. citrulli* y como nueva especie *A. oryzae* sp. nov. (para los aislamientos de arroz), agente causal de estriado bacteriano del arroz. Según el análisis filogenético basado en las secuencias del gen 16S rRNA, estas especies de *Acidovorax* fitopatógenas se agrupan juntas y las cepas no fitopatógenas se agrupan como un clado separado (Giordano *et al.*, 2012). Willems and Gillis (2015) sostiene la clasificación de las tres subespecies de *A. avenae* como así también Li *et al.* (2017) y Dhkal *et al.* (2018) en trabajos recientemente publicados.

En este estudio, adoptaremos la nomenclatura propuesta por Schaad *et al.* (2008).

*A. avenae* presenta células de 0,6-0,8 × 1,5-1,9 μm, es Gram-negativo, móvil y posee un flagelo polar. Las colonias son circulares, translúcidas, de coloración

blanco-crema, convexas y aplanadas. La infección entre plantas se realiza por salpicaduras de lluvia y viento, y es favorecida por pequeñas heridas producidas por el roce entre las hojas. La diseminación a largas distancias es realizada por el viento que desprende y transporta pequeñas plaquetas de exudados bacterianos adheridas a las hojas. El inóculo sobrevive entre un ciclo y otro de cultivo en plantas “guachas”, en restos de hojas adheridos a las yemas (caña semilla), y en menor medida en hospederos alternativos que no cumplen un rol importante en la transmisión (Grisham y Johnson 2015). Cabe mencionar que la transmisión no se produce por semilla (caña semilla) ya que no es una enfermedad sistémica (Rott y Davis 2000). El uso de variedades resistentes es el sistema de manejo más efectivo de control, así, en las regiones donde las condiciones climáticas favorecen la ocurrencia de epifitas, no se pueden cultivar variedades susceptibles (Almeida, 2008).

La estría roja ha sido reportada en prácticamente todas las regiones cañeras del mundo, aunque en muchas de ellas no llega a significar grandes niveles de daños. En general, cuando las condiciones son favorables a la enfermedad, ocurren pérdidas en el rendimiento del orden del 15% o más, debido a la forma aguda de la enfermedad (Martin y Wismer, 1989).

En Argentina, la estría roja ha demostrado su potencial peligrosidad con un sensible crecimiento en la incidencia y severidad en lotes de variedades comerciales cultivadas, ocasionando pérdidas a nivel productivo que pueden significar una disminución del rendimiento estimado en 1.500 kg/ha de azúcar dependiendo de las condiciones del cultivo y de manejo. Asimismo, la elevada presión de inóculo sobre variedades tolerantes y moderadamente tolerantes, tornándolas susceptibles, produce un patosistema altamente riesgoso.

### **I.3.2. El patosistema caña de azúcar-*Acidovorax avenae***

Actualmente la estría roja se puede considerar como la segunda enfermedad de mayor importancia en el cultivo de caña de azúcar en nuestro país. Después de la fuerte incidencia que se observó desde el año 2002 hasta la fecha la enfermedad reportó distintos grados de severidad en nuestra provincia

según los años, las zonas productoras y las variedades afectadas. En Salta y Jujuy los ataques de estría roja son mayores, pero también con diferentes grados de severidad según los años y las condiciones ambientales. Los cambios en algunas pautas de manejo como la rotación con soja en lotes antecesores a la renovación de los cañaverales y la cosecha en verde, con una mayor disposición en el campo de residuos agrícola de cosecha, generan cambios en las condiciones predisponentes que pueden favorecer el incremento del inóculo inicial de la bacteria. Por todo esto, como se mencionó anteriormente, los programas de mejoramiento genético están valorando con más atención el grado de resistencia de los clones promisorios, en especial en las etapas finales del programa y en distintos ambientes agroecológicos.

Durante las campañas 2008-2009 y en 2013-2014, se registraron elevados valores de incidencia y disminución potencial en el rendimiento cultural por pérdidas de tallos. La última campaña, presentó la particularidad de elevadas incidencias en áreas de baja infestación (pedemonte) y en variedades tolerantes (L 91-281), que venían mostrando buen comportamiento.

EEA INTA Famaillá, desde las áreas de mejoramiento genético y fitopatología de caña de azúcar determinaron que, de las variedades cultivadas en Tucumán, la denominada TucCP 77-42 es la más afectada en la zona productora de los departamentos de Burruyacú y Cruz Alta (Pérez Gómez et al., 2010; Rago et al., 2008), se determinó el tiempo de sobrevivencia de la bacteria en condiciones de post cosecha (Di Pauli et al., 2012) y se reportó por primera vez la identificación molecular y la presencia de al menos cuatro biotipos de esta bacteria en la región cañera del Noroeste de Argentino (Fontana et al., 2013).

Numerosos aspectos deben tenerse en cuenta para entender el comportamiento de esta bacteriosis para un control integral del patosistema en estudio. Entre ellos, aspectos relacionados al sistema de cultivo y la cosecha de caña de azúcar con el avance de la cosecha en verde en relación a la cosecha con quema previa del cañaveral a partir de la prohibición de la quema en la provincia por ley N° 6253. Por otro lado, el sistema de manejo agronómico y cultural de la caña de azúcar donde la soja es el principal cultivo antecesor en la rotación, para

alternar entre una plantación y otra de caña de azúcar (Fandos et al., 2013), se considera entre los factores de manejo más importantes que pueden inducir cambios en el patosistema y todo el ambiente del cultivo. Estas prácticas incluyen además el residuo agrícola de cosecha (RAC) que tampoco se quema y constituye una cobertura de gran volumen de biomasa en el suelo.

En Tucumán, principalmente en la zona centro-este, en los departamentos de Burreuyacú y Cruz Alta, se observó que luego de la rotación con soja, en un ciclo siguiente de plantación de caña de azúcar, el porcentaje de plantas afectadas con estría roja se incrementa notablemente. Este dato resulta entendible considerando que según Fandos et al. (2013), Cruz Alta es la zona de mayor porcentaje de lotes con rotación con soja en los últimos diez años, en coincidencia con Pérez Gómez et al. (2010) quienes informaron que esta zona es la de mayor incidencia de estría roja en la provincia. La soja podría generar modificaciones en la composición de los suelos, resultando en un aporte de nutrientes, especialmente nitrógeno (N), que aumentaría la fertilidad del suelo disponible no solo para el cultivo sino también para la bacteria (Huber y Thompson, 2007) favoreciendo el establecimiento del patógeno en el agroecosistema de cultivo de caña. Estudios recientes de Johnson et al. (2016) han demostrado que la incidencia de estría roja aumenta con la mayor disponibilidad de nitrógeno, con mayores efectos en suelos pesados. También indican que existe una correlación positiva entre el aumento de la incidencia de estría roja con varias propiedades del suelo, incluido el fósforo, potasio y zinc. Esta asociación entre los altos niveles de fertilidad y el aumento en la incidencia de la enfermedad fue reportada en Louisiana (EEUU) para la roya marrón de caña de azúcar (Johnson et al., 2007) y en Florida (EEUU) para la misma enfermedad (Anderson et al., 1990).

#### **I.4. Implementación de métodos moleculares en la tipificación de fitopatógenos**

La correcta identificación del agente etiológico es fundamental para desarrollar medidas de control efectivas, optimizar los recursos y reducir los efectos negativos en el medio ambiente (Barnes, 1994). El diagnóstico de

enfermedades vegetales requiere integrar el conocimiento tanto del patógeno como de la función de todos los factores que determinan el desarrollo de la enfermedad. En particular cuando hablamos de aislados bacterianos es fundamental comprender la dinámica epidemiológica y la evolución de dichos patógenos. Numerosas técnicas serológicas y enfoques de genotipado, se han aplicado para la detección, diagnóstico y caracterización de bacterias, y siguen usándose rutinariamente. (Holt 1994). Técnicas basadas en marcadores moleculares y en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tienen cada vez mayor uso y diversas aplicaciones. Más recientemente, el advenimiento de la taxonomía polifásica estimuló la integración de datos e información de orden fenotípicos, genotípicos y filogenéticos (Fontana et al., 2005).

La amplificación específica de secuencias de ácido nucleico mediante PCR (o algunas de sus variantes, RT-PCR, BIO-PCR, real-time-PCR) es uno de los métodos de mayor uso y eficiencia en el diagnóstico e identificación de patógenos vegetales (Mumford et al., 2006). Permite la detección de un patógeno aun cuando éste se encuentre en muy bajas concentraciones en el tejido vegetal, habiéndose empleado mucho en detección de patógenos de semillas, cultivo de tejidos, plantas propagadas vegetativamente, entre otros (Henson y French, 1993, Schaad et al., 1995). Una de sus principales ventajas es que resulta altamente específico, sensible y rápido y utiliza insumos de relativamente fácil acceso y de bajo costo (Li et al., 2008). Además, no existe necesidad de cultivar los organismos antes de la detección. La alternativa de mayor éxito en PCR cuantitativa es la PCR en tiempo real en la que el producto de la amplificación es detectado a medida que se va acumulando. La cantidad de producto generado es proporcional al incremento en la señal que se produce ciclo tras ciclo y puede ser monitoreado (Schaad and Frederick 2002).

El desarrollo de métodos de tipificación molecular basados en *fingerprint* (huella digital) han contribuido a distinguir con precisión las variantes genéticas de numeroso patógenos; entre éstos RAPD “Random Amplified Polymorphic DNA” (amplificación aleatoria de ADN polimórfico), AFLP “Amplified Fragment Length Polymorphism” ( Polimorfismos en la longitud de los

fragmentos amplificados) , RFPL “Restriction Fragment Length Polymorphism” (fragmentos de restricción de longitud polimórfica) y PFGE “Pulse Field Gel Electrophoresis (electroforesis en gel de campo pulsado) se han aplicado ampliamente en la caracterización de bacterias fitopatógenas (Stead, 1995; Walcott et al., 2000; Fontana et al., 2013; Pulawska et al., 2013; Yan et al., 2013, Silva et al., 2016; Li et al., 2017; Dhkal, et al., 2018). Además, la combinación de estos métodos con técnicas basadas en el análisis de secuencias como MLST (Multilocus Sequence Typing) introdujo información valiosa en el campo de la investigación epidemiológica de los patógenos bacterianos y en la detección de posibles eventos de recombinación (Feng et al., 2009; Yan et al., 2013; Tomasini et al., 2014; Silva et al., 2016; Zeng et al., 2017).

Particularmente, desde hace más de veinte años, los avances en la aplicación de herramientas moleculares al estudio de fitopatógenos en caña, brindó información sumamente valiosa permitiendo un mejor manejo del cultivo, orientando asimismo los programas de mejoramiento genético hacia la obtención de variedades que evidencien una mejor respuesta a las principales variantes patogénicas.

Entre los trabajos más recientes a nivel mundial, se pueden mencionar el de McNeil et al. (2018) de estudios de resistencia a carbón (*Sporisorium scitamineum*) mediante RNA-seq, de Khalil et al. (2018) caracterización del genoma de virus del amarillamiento (Sugarcane Yellow Leaf Virus), el de Moradi et al. (2017) sobre la caracterización del virus del mosaico estriado (Sugarcane Streak Mosaic Virus), Peixoto-Junior et al. (2014) que describe la diversidad genética de aislados de roya marrón (*Puccinia melanocephala*) en Brasil y Sharma y Tamta, (2017) donde aplican marcadores RGAP ( Resistance Gene Analog Polymorphism) para la caracterización del gen resistente a la podredumbre roja (red rot) causada por el hongo *Colletotrichum falcatum*.

Algunos trabajos importantes en nuestra región fueron los reportados por Perera et al. (2009), Bertani et al. (2014) y Fontana (2010); Fontana et al. (2013) para mosaico, amarillamiento y estría roja de la caña de azúcar respectivamente,

donde se implementaron diferentes técnicas como RFPL, REP-PCR, ARDRA y RAPD.

#### **I.4.1. MLST “Multilocus Sequence Typing”**

Para minimizar los inconvenientes que presentan algunas técnicas de *fingerprinting*, Maiden et al. (1998) y Maiden (2006) introdujeron la tipificación de secuencias multilocus (MLST), una metodología de tipificación basada en secuenciación de una región corta (<1 kb) de genes “housekeeping”. Los alelos encontrados en cada gen (generalmente se analizan siete genes) son numerados arbitrariamente (usualmente en el orden en que son encontrados), de modo que cada aislamiento está representado por los siete números correspondientes a los alelos en cada uno de los siete genes. Cada combinación de alelos se llama “sequence type” (ST), y cada tipo de secuencia está únicamente numerada. Así, una cepa determinada puede ser representada por su número ST, definida por siete números de alelos específicos. La aceptación del método para describir bacterias patógenas en las plantas ha sido más lenta, sin embargo, un número creciente de esquemas de MLST se han desarrollado incluyendo *Pseudomonas syringae*, *Xylella fastidiosa*, fitoplasmas de árboles frutales, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas* spp., y *Acidovorax citrulli*, algunos de los cuales han sido integradas en la base de datos PAMDB (“Plant-Associated Microbes Database”) (Almeida et al., 2010).

En MLST los términos “sequence type” (ST) o “genotipo multilocus” se refieren a secuencias de fragmentos de genes individuales que posteriormente se combinan para formar un “Allelic Profile” o perfil alélico, “clado” en el contexto filogenético se refiere a un grupo de especies con un ancestro común. Un caso similar ocurre con la palabra “cluster” la cual fue incluida en el esquema MLST como “clonal cluster” o “complejo clonal” para definir grupos de aislamientos delimitados por el software eBURST (Feil et al., 2004). Para MLST, cada complejo clonal se define como un grupo de genotipos que comparten al menos cinco loci con al menos un miembro del grupo, por lo que estos complejos son mutuamente excluyentes (Feil et al., 2004). Otro término utilizado frecuentemente a partir de

eBURST es “singletons” el cual hace referencia a los aislamientos que no pertenecen a ningún complejo clonal (Urwin y Maiden, 2003).

## **I.5. Estudio de las comunidades microbianas en el agroecosistema caña de azúcar mediante técnicas directas**

El suelo también juega un rol importante en el desarrollo de una determinada enfermedad, se pueden presentar diferentes condiciones de uso y/o manejo del suelo que inciden en la biodiversidad misma creando o fomentando interacciones más o menos favorables para el control de un patógeno. Tradicionalmente cuando se habla de procesos infecciosos en las plantas se concentra toda la atención en el binomio planta-agente causal, dejando de lado una serie de conceptos indispensables para comprender el patosistema como algo integral.

### **I.5.1. La importancia de la biodiversidad en los ecosistemas agrícolas**

De acuerdo a la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales, "la biodiversidad abarca todas las formas de vida, ecosistemas y procesos ecológicos reconociendo su jerarquía a nivel genético, taxonómico y de ecosistema". Estos conceptos relacionados con la macroecología, son relevantes para la diversidad microbiana y para la conservación del acervo génico; en este sentido, existe un gran desconocimiento de la variabilidad microbiológica y del enorme potencial para la innovación tecnológica que su inventario puede producir. El registro y descubrimiento de un fenómeno biológico explotable constituye el punto de partida para un desarrollo biotecnológico en donde la eficiente planificación y optimización de los programas de investigación son de suma importancia.

“El campo científico-tecnológico de la Biotecnología se sustenta en el conocimiento de los mecanismos moleculares responsables de la organización estructural y funcional de los seres vivos y a partir del mismo se desarrollan tecnologías con aplicaciones en los sectores agropecuario, industrial, ambiental y sanitario” (Diamante e Izquierdo 2004). Así, la Biotecnología constituye un área

estratégica para el mejoramiento genético vegetal y animal, la agroindustria, la prospección, caracterización y utilización de variabilidad genética y la protección del ambiente. Desde el punto de vista genético se debe tener en cuenta que cada secuencia de ADN es única e irremplazable, con lo cual la desaparición de cualquier especie biológica implica la pérdida irreversible de un conjunto único de información. El anterior ensamblaje de genética y funcionalidad lleva a hablar de biodiversidad: “variedad y variabilidad de todas las formas de vida, el complejo ecológico en el cual están presentes y los procesos de los que forman parte” (Atlas, 1984; Olembo, 1991)

Los recursos naturales disponibles, la competencia y condiciones físicas o químicas del ambiente, definen el nicho particular de cada organismo. La multiplicidad de estos factores sobre la tierra, induce (por el principio de conservación de la vida) mecanismos de adaptación o mutación que fundamentan la diversidad metabólica de los microorganismos y explica la biodiversidad existente. El desarrollo de los ecosistemas fue lo que permitió el mantenimiento de la vida en la tierra. Desde el punto de vista de la termodinámica, un ecosistema es un sistema abierto, muy alejado del equilibrio y tiene tres componentes: los seres vivos, los productos químicos de su metabolismo y el ambiente fisicoquímico, que es modificado por la actividad de los propios (micro) organismos. Los organismos se necesitan unos a otros para obtener alimento y eliminar los residuos sólidos, líquidos o gaseosos. Ninguna especie puede reciclar los productos de su metabolismo. En un ecosistema, gran parte de la diversidad existente es funcionalmente redundante lo que le imparte flexibilidad, de modo que la pérdida de ciertas especies es absorbida por la presencia de otras con funciones similares. Los ecosistemas singulares, libres de contaminación por cepas de origen industrial constituyen una fuente potencial de cepas (Amann, 2000), con propiedades prometedoras para su aplicación industrial. La clasificación taxonómica de un gran número de cepas autóctonas, que generalmente presentan alta variabilidad fenotípica, puede inducir a superposiciones o ambigüedades cuando se emplean métodos clásicos de identificación y agrupamiento. La aplicación de técnicas multivariantes

computacionales facilitan este trabajo y disminuyen los errores causados por inclusiones deficientes en un grupo determinado.

El uso de los métodos convencionales para la identificación de cada uno de sus miembros resulta insuficiente. Existen dos alternativas para la determinación de la estructura microbiana de las comunidades agrícolas, una consiste en aislar los microorganismos presentes y tipificarlos y la otra es utilizar métodos que no dependan del cultivo, extrayendo los ácidos nucleicos directamente del sistema en estudio (suelo, planta, agua, etc.).

El desarrollo de técnicas moleculares independientes de cultivo ha permitido explorar la diversidad microbiana, analizar la estructura de las comunidades revelando que la diversidad microbiana es mucho mayor de lo que se había considerado. El primer paso es la extracción y purificación del ADN de las muestras. Ésta puede ser directa (extracción del ADN total de la muestra) o indirecta (aislamiento de microorganismos de la muestra, seguida de la extracción de ADN). Posteriormente se amplifican, mediante PCR ciertas regiones variables del gen ribosomal 16S. Dependiendo del grupo de microorganismos que se desee estudiar, se usan desde cebadores muy generales hasta muy específicos. Para la separación de los fragmentos de ADNr 16S amplificados, es necesario construir bibliotecas de clones de ADNr 16S, cuya posterior secuencia y análisis permite determinar la diversidad microbiana. Es posible identificar o determinar cuáles son los microorganismos conocidos más cercanos a los miembros de la comunidad mediante la comparación de las secuencias de los fragmentos de ADNr 16S con las bases de datos, como RDP (Ribosomal Database Project) o Genbank (METAGENOMICA del gen ribosomal 16S). La obtención de huellas digitales o “fingerprinting” que constituyen un patrón o un perfil de la diversidad genética de una comunidad microbiana mediante la separación electroforética de los fragmentos de ADNr amplificados, como DGGE/TGGE, también continúan siendo utilizadas.

**I.5.1.1. DGGE** “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis” (Electroforesis en gel con gradiente desnaturante). Esta técnica permite separar fragmentos de

la misma longitud, pero con diferentes secuencias, obtenidos mediante la amplificación por PCR de regiones del gen 16S ribosomal a partir del ADN total de una comunidad microbiana. De hecho, es posible separar fragmentos que difieren en una sola base. Los agentes desnaturalizantes, una mezcla de urea y formamida en el caso del DGGE (temperatura en el caso de TGGE, otra técnica muy similar) provocan la separación de las cadenas dobles de ADN. Es necesario determinar cuál de las regiones variables de los genes ribosomales permiten separar los microorganismos presentes, así como optimizar el gradiente y la duración de la electroforesis para obtener la mejor separación de las bandas.

### **I.5.1.2. Metagenómica**

Los avances tecnológicos de los últimos 10 años han conducido al desarrollo de la secuenciación de nueva generación (“next generation sequencing” NGS), también conocida como secuenciación de alto rendimiento (“high throughput sequencing” HTS). Las nuevas plataformas se distinguen por su capacidad de secuenciar millones de fragmentos de ADN de forma paralela. Además, la secuenciación masiva tiene el potencial de detectar todos los tipos de variación genómica en un único experimento, incluyendo variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, y también variantes estructurales (Rodríguez-Santiago y Armengol, 2012).

La metagenómica se puede definir como el análisis funcional y de secuencia independiente de cultivo de toda la colección de genomas microbianos presentes en diferentes nichos o ambientes. El método aplica un conjunto de tecnologías genómicas y herramientas bioinformáticas para acceder directamente al contenido genético de comunidades enteras de organismos. (Cadena Zamudio et al., 2016).

Gracias al advenimiento de métodos moleculares que no requieren el cultivo de microorganismos, en los últimos años se ha incrementado el conocimiento de la diversidad microbiana en comunidades complejas. La posibilidad de secuenciar directamente los genomas de microbios, sin necesidad

de cultivarlos abrió nuevas posibilidades que significaron un cambio de rumbo en la microbiología.

Actualmente, las técnicas más nuevas permiten secuenciar directamente el ADN de una muestra, y evita la necesidad de crear una biblioteca, es decir que no contiene “volúmenes” (genomas) separados de cada especie, sino que consiste en una mezcla de millones de fragmentos de ADN al azar de todos los microorganismos muestreados de una comunidad.

Luego, el tratamiento de la biblioteca de genomas (metagenoma), depende del objetivo de búsqueda. En proyectos de metagenómica basados en secuencias del gen ribosomal 16S, se obtiene información sobre la composición taxonómica de los microorganismos presentes en la muestra. La metagenómica puede ser usada además para analizar el genoma de una comunidad como un todo, lo cual ofrece información sobre la ecología de la población y la evolución.

En análisis de la composición y de la diversidad presentes en una comunidad requiere la aplicación de diferentes herramientas estadísticas, la capacidad de ensamblado e interpretación de la información obtenida de los metagenomas, es el mayor desafío de la bioinformática. Algunos de los conceptos básicos en los análisis metagenómicos son:

-El análisis de las secuencias basado en la identificación y distribución de OTUs (Unidad Taxonómica Operativa) y en los valores de diversidad alfa ( $\alpha$ ) y beta ( $\beta$ )

-Diversidad Alfa o “Alpha-diversity” define la riqueza y homogeneidad de la comunidad microbiana analizada individualmente.

-Diversidad Beta o “Beta-diversity” hace una comparación entre diferentes comunidades tomando en cuenta distribución de especies (OTUs), especies dominantes y proporción de cada una de ellas dentro de todas las comunidades analizadas. Algunos índices y parámetros de diversidad alfa son: i) Curvas de rarefacción, se hacen para cada una de las muestras de las cuales se consiguió un número tal de secuencias que pudieron ser identificadas en OTUs, lo ideal es que cada muestra llegue a una meseta; ii) Índice de Simpson, indica la dominancia de las especies y refleja la probabilidad de que dos individuos

pertenecientes a la misma especie sean elegidos al azar (varía de 0 a 1 siendo 1 la máxima diversidad); iii) Índice de Shannon, mide el grado medio de incertidumbre, su valor aumenta a medida que aumenta el número de especies y cuando la distribución de los individuos entre las especies se hace pareja, y iv) Índice Chao que es una medida de riqueza. Los índices y parámetros de diversidad Beta más comunes son: Heatmaps que permite visualizar la frecuencia de aparición de cada OTU en cada una de las muestras, es una medida de la distribución; Análisis de Coordenadas principales PCoAy análisis de agrupamientos “clusters” o Dendrogramas, que indican que tan parecida es la composición entre las muestras.

## **I.6. Hipótesis y objetivos**

### **Hipótesis**

En base a las consideraciones expuestas precedentemente y considerando que la expansión del cultivo hacia zonas no tradicionales del Noreste Argentino (NEA), hace necesario explorar y ampliar el conocimiento de nuevos biotipos presentes en esas áreas, en el presente trabajo de tesis se formula la siguiente hipótesis:

*Acidovorax avenae*, agente causal de la Estría Roja en caña de azúcar, presenta diversidad genética que muestra una fuerte asociación con el genotipo de caña de azúcar en las provincias de Tucumán y Salta (NOA). Mediante el uso de técnicas basadas en análisis de secuencias de genes específicos, posiblemente involucrados en vías metabólicas principales, se puede realizar una caracterización exacta e inequívoca de las cepas del NOA y NEA.

Un sistema de manejo de cultivo de caña de azúcar con rotación con soja, sirve de modelo para estimar las relaciones entre la microbiota presente en el suelo y el desarrollo de la enfermedad desde un enfoque integral del patosistema.

## **Objetivo General**

La presente tesis de doctorado tiene como objetivo general caracterizar genéticamente las cepas de *Acidovorax avenae* aisladas a partir de los genotipos de caña de azúcar disponibles en la región cañera de Argentina, con particular énfasis en el estudio de la diversidad genética.

### **Objetivos específicos**

- Aislar *A. avenae* a partir de diferentes áreas de cultivo de caña de azúcar.
- Identificar taxonómicamente los aislamientos mediante técnicas clásicas y moleculares.
- Tipificar las cepas de *A. avenae* mediante análisis de secuencias multilocus.
- Secuenciar el genoma de una cepa seleccionada de *A. avenae*.
- Estudiar la presencia de genes potencialmente relacionados con mecanismos de patogenicidad de la bacteria mediante estudios comparativos de genomas.
- Estimar la microbiota principal presente en el sistema de cultivo en estudio mediante técnicas independientes de cultivo.

## Capítulo II

---

### Materiales y Métodos

---

## **II.1. Aislamiento y caracterización de *Acidovorax avenae***

### **II.1.1. Muestreo de plantas**

El muestreo se realizó sobre hojas de caña de azúcar que exhibían síntomas típicos de estría roja (Fig.2.1 A y B).

La selección del material en la región NEA, se realizó siguiendo la red de ensayos de INTA, en lo que constituye la Red Caña debido a que en esta región el cultivo no presenta extensas áreas, sino que se trata de pequeñas explotaciones, muchas veces con variedades desconocidas. Por este motivo, la recolección del material vegetal se realizó en sitios de ensayos y/o en otros cañaverales cercanos de la zona, donde se observaban síntomas característicos, ya sean estas variedades de ensayos INTA o material desconocido, que como se mencionara anteriormente, es muy frecuente en la región. Este procedimiento se implementó en las provincias de Santa Fe, Misiones, y Formosa, que, a los fines de la Red Caña, se engloba como NEA. También se tomaron muestras en la zona productora del ingenio Tabacal, en la provincia de Salta y del Ingenio Ledesma, provincia de Jujuy. (Tabla 2.1).

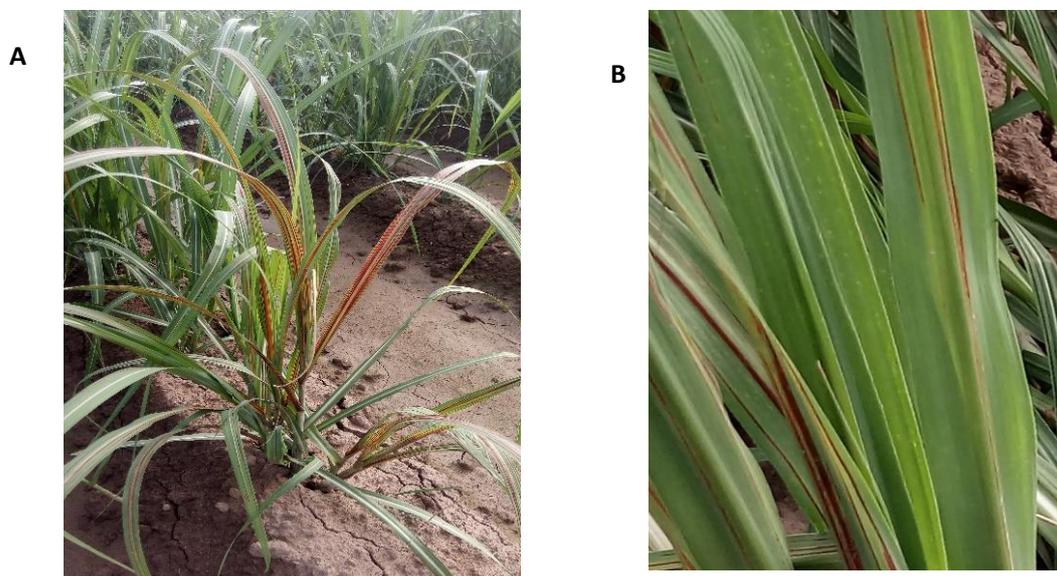
En todos los casos, se seleccionaron plantas jóvenes, de aproximadamente cuatro meses de edad, ya que en éstas es donde los síntomas de la enfermedad se observan en progreso (Fig.2.1 B), con el frente de avance de la bacteriosis claramente visible.

Las muestras se acondicionaron en bolsas plásticas tipo “ziploc” con papel absorbente, para su conservación hasta el momento de su procesamiento. Se fraccionaron hojas en sobres de papel para ser refrigerados entre 4 a 7° C para su uso inmediato y por otro lado se colocó otra porción a -20°C para su conservación a largo plazo. También se desecaron hojas con la finalidad de confeccionar un exicata.

**Tabla 2.1:** Localidades donde se realizó la recolección de muestras y variedades muestreadas.

ID* Muestra	Variedad	Año	Localidad	Provincia
16	Desconocida	2013	El Colorado	Formosa
17	NA 85-1602	2013	Tacuarendí	Santa Fe
18	NA 85-1602	2014	Tacuarendí	Santa Fe
19	Fam 04-1604	2014	Tacuarendí	Santa Fe
20	INTA CP 98-828	2014	Villa Ocampo	Santa Fe
21	Desconocida	2014	Las Toscas	Santa Fe
22	NA 02-2320	2014	Tabacal	Salta
23	Desconocida	2014	San Javier	Misiones
24	NA 96-2929	2017	Ledesma	Jujuy

NOTA: \*ID muestra corresponde al número consecutivo asignado a cada muestra de hojas sintomáticas para aislamientos desde 2008 a la fecha.



**Fig. 2.1:** A-Planta joven de caña exhibiendo síntomas de un ataque severo de estría roja; B-Detalle lesión típica de estría roja en hojas.

## **II.1.2. Aislamientos e identificación de *Acidovorax avenae***

Protocolos específicos, como así también las fórmulas de medios de cultivo y soluciones, fueron extraídas de la Guía de Laboratorio para la Identificación de Bacterias Patogénicas de Plantas (Schaad et al., 2001).

El material de partida fueron hojas refrigeradas mantenidas por no más de 15 días en heladera entre 4 y 7 °C. Este material fue seccionado en pequeños trozos y desinfectado mediante dos tratamientos de 1 min con alcohol 70% y un lavado de 1 min con agua estéril. A continuación, el material (aproximadamente 0,5 g) fue macerado manualmente en tubos estériles tipo Eppendorf utilizando como diluyentes distintas soluciones estériles. El sobrenadante obtenido se utilizó como primera dilución y a partir de éste se realizaron sucesivas diluciones decimales para realizar los plaques sobre diferentes medios de cultivos (Tabla 2.2), los que fueron incubados a 30°C durante 48-72h.

Se realizaron observaciones cada 24 h para evaluar el desarrollo de colonias. A partir de esos cultivos en placas se hicieron sucesivos repiques al medio líquido (Tabla 2.2) y nuevos plaques hasta obtener las colonias individuales y puras para su conservación y posterior identificación mediante pruebas preliminares. Algunos de los medios que se emplearon, como así también las soluciones diluyentes y las condiciones de cultivo, se describen a continuación.

### **II.1.2.1. Medios de cultivo**

#### **Componentes, esterilización y determinación de pH**

Los componentes en gramos (g) para preparar 1 litro (L) de cada uno de los medios de cultivo usados en este trabajo de tesis se describen a continuación. Salvo indicaciones especiales, todos fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos (min) a 121°C. El pH de los medios fue ajustado adicionando NaOH 10 M. Las medidas de pH se efectuaron con un peachímetro Altronix modelo TPX I.

**1-Solución Fisiológica.** Se utilizó para la homogeneización y preparación de diluciones en la mayoría de los aislamientos. 9,0 g de NaCl disueltos en 1 L de agua destilada, ajustar el pH en  $7,0 \pm 0,2$ .

**2-Agar nutritivo.** Medio de uso general. Fue el medio más empleado por su simplicidad y fácil composición.

<b>Componentes</b>	<b>g/L</b>
Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
NaCl	3,0
Agar	17,0
Agua csp	1 L
	pH: 7,0

**3-Agar extracto de levadura-dextrosa-carbonato de calcio (YDC).** Medio diferencial.

<b>Componentes</b>	<b>g/L</b>
Extracto de levadura	10,0
Glucosa	20,0
Carbonato de calcio	20,0
Agar	15,0
Agua csp	1 L
	pH: $6,9 \pm 0,2$

**3-Caldo LB (del inglés Lysogeny Borth ex Luria Bertani).** Este medio se utilizó para el crecimiento de la bacteria en condiciones de aerobiosis, en los repiques entre plaqueos y también para su conservación y obtención de cultivos de células puras.

<b>Componentes</b>	<b>g/L</b>
Extracto de levadura	5,0
Tripteína	10,0
NaCl	7,5
Agua csp	1 L
	pH: $7,4 \pm 0,2$

En la Tabla 2.2 se detallan los diferentes medios de cultivo, general y diferencial con las respectivas condiciones de incubación.

**Tabla 2.2.** Medios de cultivos generales y semiselectivos para el aislamiento de *Acidovorax avenae*.

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Condiciones de incubación</b>
Agar Nutritivo	48 h a 37°C
YDC	48 h a 30°C
LB	48 h a 30°C /aerobiosis con agitación

### II.1.2.2. Conservación de las cepas

Los cultivos puros obtenidos a partir de los medios de cultivo indicados fueron crecidos en el medio líquido LB. Esto se realizó a 30°C y con agitación permanente para crear condiciones aeróbicas ya que se trata de un organismo que tiene un metabolismo aerobio estricto. Un cultivo de 16 h aprox., se repartió en viales, recuperándose las células por centrifugación y resuspendiéndolas en medio fresco con 20% de glicerol estéril (agente crioprotector). Las mismas se almacenaron a -80°C hasta la identificación y caracterización fenotípica y genotípica de cada aislamiento. Asimismo, que empleo un método de conservación alternativo para el uso a corto plazo que consistió en resuspender las células el medio LB semisólido (0,7% agar) y mantener los mismo a temperatura ambiente.

### II.1.2.3. Pruebas fenotípicas para la identificación de los aislamientos

Las colonias aisladas (entre 10 y 15 por placa) fueron caracterizadas en forma preliminar mediante las siguientes técnicas microbiológicas clásicas:

**-Observación microscópica (en fresco):** para la determinación de la morfología de las células bacterianas a partir de un cultivo en medio líquido, se empleó un aumento 100X en aceite de inmersión.

**-Tinción de Gram:** se utilizó el kit de Britania para tinción de la pared celular. A partir de un cultivo de células de 24 h en caldo LB, se colocó sobre portaobjeto 100 µL de la suspensión, se dejó secar en cámara de flujo laminar y se procedió de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante.

**-Actividad oxidasa:** se emplearon discos de papel reactivo de Britania. En este caso también se empleó un cultivo de células como en el punto anterior.

El cambio de coloración (gris o rosado) en el disco en contacto con las células bacterianas, indica si la reacción es negativa o positiva, respectivamente

**-Pruebas de movilidad:** se realizó en tubos de ensayo con medio agar nutritivo semisólido (0,7% agar), se sembró el inóculo con palillo estéril en el fondo del tubo, se incubó a 37 °C y se observó el crecimiento a las 48 h. El crecimiento más allá de la línea de punción indica que se trata de células móviles.

#### **II.1.2.4. Identificación taxonómica de los aislamientos por técnicas moleculares**

La identificación molecular de los aislamientos se realizó mediante PCR especie-específica y secuenciamiento del gen ARNr 16S.

##### **II.1.2.4.1. Tampones y soluciones**

###### **1-Tampón TE (Tris-EDTA)**

<b>Componentes</b>	<b>Concentración final</b>
EDTA (Genbiotech)	1 mM
Tris (Genbiotech)	10 mM
	pH: 8,0

###### **2-Solución de dodecil sulfato sódico (SDS)**

<b>Componentes</b>	<b>Concentración final</b>
Dodecil sulfato sódico (Sigma)	20%
Tris (Roche Diagnostics)	50 mM
EDTA (Roche Diagnostics)	20 mM
	pH 8,0

### 3-Tampón TAE 50x (Tris-Acetate-EDTA)

Componentes	Concentración final
Tris (Roche Diagnostics)	242 g
EDTA (Roche Diagnostics)	0,5 M
Ácido acético glacial (Sigma)	57,1 ml
	pH 8,0

### 4-Tampón TBE 10x (Tris-Borate-EDTA)

Componentes	Concentración final
Tris (Genbiotech)	108 g
EDTA (Genbiotech)	0,5 M
Ácido bórico (Genbiotech)	55 g
	pH 8,0

#### II.1.2.4.2. Obtención de ADN cromosómico a partir de cultivos puros

Se ensayaron diferentes métodos y kits para la obtención rápida de ADN a partir de cultivos puros de las cepas aisladas. Los que mostraron mejores resultados fueron:

**-Microlysis** (LABOGEN, UK), se obtiene ADN puro para ser usado en reacciones de PCR únicamente, se adiciona 1-2  $\mu$ L de una suspensión celular "o.n"., o bien a partir de una colonia obtenida directamente de la placa de agar con 18-19  $\mu$ L de microlysis 20x.

**-Lisis al microondas**, se obtiene ADN para ser utilizado en "screening" directo de colonias mediante PCR. Se pican colonias individuales a tubos de PCR con 5  $\mu$ L de agua bidestilada. Se realizan dos ciclos de cinco minutos cada uno a potencia máxima del microondas.

**-Método CTAB** modificado de acuerdo a Ausubel et al. (1992). El procedimiento seguido se describe a continuación:

A partir de 3 ml de un cultivo bacteriano puro en fase logarítmica crecido en medio líquido LB a 30° con agitación, se siguieron los pasos del protocolo como a continuación se detalla:

- Centrifugar a 10000 rpm durante 2 min
- Descartar el sobrenadante
- Resuspender el pellet en 567 µL de buffer TE (Tris 10mM + EDTA 1mM) + 30 µL de SDS 10% + 3 µL de proteinasa k (20 mg/ml)
- Incubar 1h a 37 °C
- Agregar 100 µL de solución NaCl 5M y 80 µL de buffer CTAB 10% (10 g de CTAB 10%, 14 ml de NaCl 5M, en un vol. final de 100 ml)
- Incubar 10 min a 65°C
- Agregar 800 µL de cloroformo:isoamílico (24:1)
- Centrifugar a 12000 rpm durante 5 min
- Transferir la fase superior y agregar igual vol. de cloroformo:isoamílico 24:1
- Centrifugar a 10000 rpm durante 5 min
- Transferir la fase superior y adicionar 2 vol. etanol
- Mantener a -20°C durante 2 h
- Centrifugar a 10000 rpm durante 5min y descartar el sobrenadante
- Lavar el pellet adicionando 600 µL de etanol al 70%
- Centrifugar a 10000 rpm durante 5min y descartar el sobrenadante
- Lavar el pellet adicionando 300 µL de etanol al 70%
- Centrifugar a 10000 rpm durante 5 min
- Dejar secar el pellet
- Resuspender en 50 µL de buffer TE + RNasa (10/1)
- Almacenar a -20°C.

El ADN obtenido mediante este procedimiento, fue monitoreado y cuantificado a través de una cuantificación electrónica con Qbit® (Invitrogen) y visualizado por electroforesis en gel de agarosa 0,7%. Se empleó en las pruebas de identificación molecular, en los analisis de diversidad genética de *Acidovorax avenae*, para las técnicas de RAPD-PCR y MLST, y para el analisis del genoma de la bacteria.

### II.1.2.4.3. Identificación de *A. avenae* mediante PCR

Para la reacción de PCR especie-específica se emplearon las condiciones del procedimiento descrito por Song et al. (2003) empleando el par de cebadores Oaf1/Oar1 para amplificar un fragmento de 550pb correspondiente a la región ITS 16S-23S.

La técnica de PCR se usó además para amplificar parcial (500pb) o completamente (1500pb), dependiendo del producto que se pretendía obtener, el gen ARNr 16S. El análisis de las secuencias obtenidas en cada caso, se empleó para la identificación de algunos de los aislamientos.

Los cebadores usados y las condiciones de amplificación para cada combinación se detallan en la Tabla 2.3 y Tabla 2.4, respectivamente.

**Tabla 2.3.** Cebadores usados para la identificación de *Acidovorax avenae*.

Nombre	Gen blanco	Secuencia (5'→3')	Referencia
P0f	16S (primer universal)	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1
P6r	16S (primer universal)	CTACGGCAACCTTGTTACGA	1
Plb	16S (primer universal)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	2
Mlb	16S (primer universal)	GGCTGCTGGCACGTAGTTAG	2
Oaf1	Especie-específico	5'GTCGGTGCTAACGACATGG-3'	3
Oar1	Especie-específico	5'AGACATCTCCGCTTTCTTTCAA-3'	3

f-cebador directo; r-cebador reverso; 1- Klijn et al. (1991); 2-Hébert et al.(2000); 3-Song et al. (2003)

**Tabla 2.4.** Combinaciones de cebadores y ciclos de amplificación.

Cebadores	Concentración Final ( $\mu$ M)	Ciclos	Anillado	Extensión	Fragmento (pb)
P0-P6	0,5	35	58°C 30''	2'	1500
Plb-Mlb	0,5	30	52°C 30''	45''	500
Oaf1-Oar1	0,4	25	55°C 30''	1'	550

#### II.1.2.4.4. Condiciones de amplificación y electroforesis

Los termocicladores utilizados para la realización de la PCR fueron el GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EEUU), y el BioRad modelo MyCycler™ (Munich, Alemania).

El programa de amplificación típico consistió en:

-Fase de desnaturalización inicial: 5 min a 94°C.

-Fase cíclica: se repite un número apropiado de ciclos a una temperatura de anillado “annealing” ( $T_A$ ) y extensión adecuada optimizado para cada reacción

-Desnaturalización: 1 min a 94°C.

-Hibridación de los cebadores (anillado): 30 seg-1 min a la temperatura de “annealing” adecuada ( $T_A$ ), según la pareja de *primers* utilizada.

-Extensión: 72°C, el tiempo necesario de acuerdo a los pares de bases (pb) del fragmento que se desea amplificar.

-Extensión final: 7 min a 72°C.

La mezcla de reacción de PCR que se utilizó se detalla en la Tabla 2.5. Para esta reacción también se probó una “mix” comercial de Promega, PCR Master Mix, cuya composición 2X es la siguiente: taq ADN polimerasa (50 U/ml), dNTPs (400  $\mu$ M) y  $MgCl_2$  (3 mM). Se empleó en una concentración 1X, tanto en la PCR especie-específica como en la amplificación de gen ARNr 16S. La optimización de las condiciones de PCR para los diferentes análisis realizados supuso, en ocasiones, la modificación de las condiciones estándares descritas dentro del rango indicado en la tabla 2.5.

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa. Se utilizaron concentraciones de agarosa al 2% para la resolución de fragmentos menores de 200 pb, 1,8% para fragmentos entre 200 y 300 pb, 1,5% para fragmentos entre 300 y 500 pb y 1% para aquellos fragmentos mayores de 500 pb. El gel se preparó con agarosa (Genbiotech y BioRad, Munich, Alemania) y tampón TAE 1x o TBE 5x

calentándose hasta la fusión y completa disolución de la agarosa. Una vez atemperada (aproximadamente a 60°C) se añadió una solución 1/10 de colorante Gel Red (Genbiotech) y se dejó solidificar en un molde adecuado. Para la siembra, al ADN amplificado se le añadió 1 ó 2 µL del colorante indicador del frente de corrida. Los marcadores de peso molecular utilizados para la estimación del tamaño de los fragmentos de ADN fueron: 1 kb DNA ladder, 100 pb DNA ladder y 50 pb (Promega y Genbiotech), dependiendo del caso. Las electroforesis se realizaron en tampón 1x TAE o TBE 5x y el gel se visualizó con luz UV en un transiluminador.

**Tabla 2.5.** Componentes y concentraciones de las mezclas de PCR.

<b>Componentes</b>	<b>Concentración Stock</b>	<b>Concentración final</b>
Tampón de PCR	10x	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5-3,5 mM
dNTPs (dATP,dCTP,dGTP, dTTP)	10 mM	200 µM c/u
Cebador directo y reverso	10-30 µM c/u	0,4-2,0 µM c/u
Taq ADN polimerasa	5 U/ µL	0,1-0,5 U
ADN muestra	-----	10-20 ng
Agua estéril csp	25 ó 50 µL	

El tampón de PCR 10x provisto con la Taq polimerasa contiene: 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,3) la concentración final de estos componentes en la mezcla de PCR fue de: 50 mM KCl y 10 mM Tris-HCl.

#### **II.1.2.4.5. Preparación de los fragmentos amplificados para reacciones de secuenciación**

Cuando en la PCR se obtuvo un fragmento de tamaño único, éste se purificó directamente con el kit ExoSAP-IT (Amersham USB Corporation) que consiste en el tratamiento del producto de PCR con dos enzimas; Exonucleasa I y Fosfatasa alcalina de camarón (Shrimp Alkaline Phosphatase), en sus respectivos tampones, dos enzimas que degradan los residuos de ADN de simple

cadena (cebadores) y dNTPs que no fueron usados durante la PCR. La reacción consiste en 15 min de incubación a 37°C para que actúen las enzimas y luego una inactivación a 80°C por 15 min. Otros kits usados para purificar los amplicones a partir del gel de agarosa fueron:

-GFX™ PCR DNA y Gel Band Purification kit (GE Healthcare Companies). En todos los casos se siguieron las indicaciones del fabricante. Los amplicones purificados fueron secuenciados en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar.

El análisis de las secuencias obtenidas se realizó por comparación usando el programa *Blast* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/NCBI/EEUU](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/NCBI/EEUU)), con secuencias depositadas en el banco de datos del *Genbank*.

### **II.1.3. Tipificación genética de cepas de *A. avenae***

La diversidad genética se evaluó en una primera instancia mediante RAPD-PCR, para luego seleccionar las cepas para la tipificación por multilocus (*MLST* “*Multilocus sequence typing*”). Sólo se consideraron para los estudios de diversidad las cepas PCR<sup>+</sup>. Los protocolos fueron puestos a punto en el laboratorio para poder ser adaptados a las condiciones de trabajo como así también a las características propias de las especies en estudio para automatizar al máximo el análisis.

#### **II.1.3.1. RAPD “Random Amplified Polymorphic DNA” (amplificación polimórfica del ADN al Azar)**

El genotipado mediante RAPD se realizó usando dos cebadores, considerando su capacidad para discriminar entre cepas de la misma especie y su reproducibilidad. Los cebadores fueron:(i) M13 (Huey y Hall, 1989) y (ii) RAPD2 (Cocconcelli et al., 1995). El análisis incluyó 31 cepas de *A. avenae*, 29 aisladas en el presente trabajo, más dos biotipos previamente identificados (Fontana et al., 2013), uno de Salta (S11\_3) y uno de Tucumán (T10\_61).

Las diferentes condiciones usadas en los experimentos de amplificación para cada uno de los cebadores se describen en la Tabla 2.6. Las imágenes

obtenidas como producto de la amplificación de los diferentes fragmentos fueron analizadas con ayuda del programa *Bio Numerics* ([www.applied-maths.com/bionumerics/bionumerics.htm](http://www.applied-maths.com/bionumerics/bionumerics.htm)). La matriz de similitud fue calculada utilizando el coeficiente de similitud de Dice mientras que el dendrograma fue construido por el método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). El programa *Bio Numerics* pudo ser empleado para este análisis por gentileza del Instituto de Biotecnología de INTA Castelar, que adquirió la licencia para el uso exclusivo del mismo en el mencionado instituto.

El análisis se pudo realizar sólo en los casos en que la calidad fotográfica de la imagen fue la requerida para ser leída por el programa. La mezcla de reacción optimizada para ser usada con cada uno de los cebadores fue: tampón de PCR (1x); MgCl<sub>2</sub> (3,5 mM); dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (200 µM c/u); cebador (2,0 µM); Taq ADN polimerasa (0,1 U/ µL); ADN muestra (15-20 ng); agua bidestilada estéril (csp 50 µL). Los productos de reacción se visualizaron por electroforesis en concentraciones de agarosa entre el 2,5 y 3%. Las condiciones de corridas fueron descriptas en el punto II.1.2.5.3 de este capítulo.

El protocolo de RAPD fue conducido en base a las condiciones y metodologías descriptas por Fontana et al., (2005, 2010) y optimizada para la especie en estudio.

**Tabla 2.6.** Cebadores y condiciones de amplificación para las reacciones de RAPD.

Cebadores	Secuencia (5'→3')	Desnatu- ralización	Anillado	Extensión	Ciclos
<b>M13</b>	GAG GGT GGC	94°C, 1'	45°C, 20''	72°C, 2'	40
	GGT TCT	94°C, 1'	29°C, 1'*	72°C, 2'	20
<b>RAPD2*</b>	AGC AGC GTG G	94°C, 20''	55°C, 30''	72°C, 30''	45

\* rampa de 1' 30'' para pasar de 29°C a 72°C. El ciclo de amplificación de RAPD2 consiste en dos etapas, una con 20 ciclos y otra de 45 ciclos.

### II.1.3.2. Análisis MLST “Multilocus sequence typing” (tipificación de secuencia multilocus)

#### II.1.3.2.1. Amplificación por PCR y secuenciación

Para el desarrollo de esta técnica se siguió el procedimiento descrito por Feng et al. (2009) y Yan et al. (2013) y optimizado para las condiciones de este estudio. Las cepas de *A. avenae* de caña de azúcar utilizadas para este análisis, quince en total, fueron seleccionadas a partir de una evaluación preliminar mediante reacciones de RAPD-PCR. Incluye los aislamientos obtenidos en esta tesis y cinco cepas previamente caracterizadas (Fontana et al., 2013).

Los componentes de reacción como así también los cebadores correspondientes a los siete *loci* amplificados se detallan en las Tablas 2.7 y 2.8 respectivamente. El programa de amplificación que se utilizó consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C 30 s, 60°C 30 s para la unión de los cebadores y un paso de extensión de 72°C por 30 s. La extensión final fue a 72°C durante 5 min. Las condiciones de la electroforesis para la visualización de los productos amplificados fueron descritas en el punto II.1.2.5.3 de este capítulo, de acuerdo al tamaño de fragmento esperado, como así también la preparación de los fragmentos para secuenciación en el punto II.1.2.5.4.

**Tabla 2.7.** Componentes de reacción para MLST

Componentes	Concentración Stock	Concentración final
Tampón de PCR	10x	1x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM
dNTPs (dATP,dCTP,dGTP, dTTP)	10 mM	200 µM c/u
Cebador directo e inverso	10 µM c/u	0,4 -1,0 µM c/u
Taq ADN polimerasa	5 U/ µL	0,1-0,5 U
ADN muestra	-----	5-20 ng
Agua bidestilada estéril csp	25 µL	

**Tabla 2.8.** Secuencias de cebadores para los siete genes amplificados MLST

Nombre	Gen blanco	Secuencia (5'→3')	pb
Aa_gmcf	<i>gmc</i>	TGGTTGACCTCGAAATAGCC	543
Aa_gmcr		TTTCGACTTCATCGTCATCG	
Aa_ugpBf	<i>ugpB</i>	TGAAGGAAATCTCGGTCGTC	452
Aa_ugpBr		CTTGACGTCGTTGCTGAAGA	
Aa_pilTf	<i>pilT</i>	GAGTACATCTGCGCCACCTT	404
Aa_pilTr		GAATACGGGCACATCCTGAC	
Aa_lepAf	<i>lepA</i>	GATCGACACGCCCCGGACAC	489
Aa_lepAr		TGATGTAGCCCACCTCGCC	
Aa_trpBf	<i>trpB</i>	GCCACTTCGGCCGCTATG	439
Aa_trpBr		CCTCGTTGAGCGCATCCTT	
Aa_gltAf	<i>gltA</i>	GAAGTCCACGTTCCGGGTAGA	489
Aa_gltAr		TACATGTACCCGCAGAACCA	
Aa_phaCf	<i>phaC</i>	ATCGCCAACCTGCTGCAC	431
Aa_phaCr		GAACGTGGTGAGGAAGGTGG	

Feng et al., 2009

La aplicación de MLST para estudios de diversidad genética y filogenia requiere la implementación herramientas bioinformáticas y de bases de datos donde exista información de secuencias multilocus de la especie en estudio o de especies emparentadas. Para el presente estudio se empleó la base de datos GenBank, de donde se obtuvo secuencias multilocus de la especie *Acidovorax citrulli* (o *A. avenae* subsp *citrulli*), bacteria patogénica en cultivos de cucurbitáceas, especialmente sandía y melón y de otras *Acidovorax avenae* (o *Acidovorax avenae* subsp *avenae*) aisladas en otras regiones del mundo y a partir de otros hospedantes (maíz, sorgo, vasey grass, mijo, arroz, etc.). Las secuencias se encuentran disponibles en [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) bajo el número de acceso EU928004 a EU928726. En la Tabla 2.9 se detallan las cepas analizadas; las cepas aisladas a partir de hojas sintomáticas de caña de azúcar de Argentina (cepas 1 a 15), y las secuencias tomadas de la base de datos para el análisis de genotipos multilocus (cepas 16 a 118).

**Tabla 2.9:** Cepas analizadas mediante MLST

N° de Cepa	ID Cepas	Origen geográfico	Hospedante	Año
1	S11_3	Argentina-Salta	Caña de azúcar	2009
2	SF17_4	Argentina-Santa Fe	Caña de azúcar	2013
3	SF17_5	Argentina-Santa Fe	Caña de azúcar	2013
4	SF18_1	Argentina-Santa Fe	Caña de azúcar	2014
5	SF19_4	Argentina-Santa Fe	Caña de azúcar	2014
6	SF20_1	Argentina-Santa Fe	Caña de azúcar	2014
7	SF21_2	Argentina-Santa Fe	Caña de azúcar	2014
8	S22_1	Argentina-Salta	Caña de azúcar	2014
9	S22_3	Argentina-Salta	Caña de azúcar	2014
10	M23_1	Argentina-Misiones	Caña de azúcar	2014
11	M23_4	Argentina-Misiones	Caña de azúcar	2014
12	T4_53	Argentina-Tucumán	Caña de azúcar	2009
13	T6_50	Argentina-Tucumán	Caña de azúcar	2009
14	T8_45	Argentina-Tucumán	Caña de azúcar	2009
15	T10_61	Argentina-Tucumán	Caña de azúcar	2009
16	AAA19860	EEUU	Maíz	2011
17	AC30002	EEUU	Sandía	1997
18	AAA30003	Japón	Arroz	1997
19	AAA30015	Nigeria	Arroz	1998
20	AC30042	Corea	Sandía	1997
21	AAA30044	Nigeria	Mijo	1984
22	AC30046	EEUU	Sandía	1997
23	AC30064	EEUU	Sandía	1978
24	AC30073	Brasil	Melón	-
25	AC30080	EEUU	Sandía	1978
26	AC30081	EEUU	Sandía	1978
27	AC30082	EEUU	Melón	1978
28	AC30084	EEUU	Sandía	1989
29	AC30087	EEUU	Sandía	2000
30	AC30090	EEUU	Sandía	2000
31	AC30091	EEUU	Sandía	2000
32	AC30092	EEUU	Sandía	2000
33	AC30093	EEUU	Sandía	2000

Cont. Tabla 2.9

---

34	AC30107	China	Sandía	2000
35	AC30118	China	Sandía	-
36	AC30119	China	Sandía	2000
37	AC30120	China	Sandía	2000
38	AC30121	Japón	Sandía	2000
39	AC30123	China	Sandía	2000
40	AC30137	Malasia	Sandía	2001
41	AC30139	Malasia	Sandía	2001
42	AC30140	EEUU	Sandía	1990
43	AC30142	EEUU	Sandía	1994
44	AC30143	EEUU	Sandía	1992
45	AC30144	EEUU	Sandía	1994
46	AC30145	EEUU	Sandía	1992
47	AC30146	EEUU	Sandía	1994
48	AC30147	EEUU	Sandía	1994
49	AC30148	EEUU	Sandía	1992
50	AC30150	EEUU	Sandía	1978
51	AC30151	Australia	RockMelón	1999
52	AC30152	Australia	RockMelón	1999
53	AAA30179	Brasil	Sorgo	1987
54	AC30224	China	Melón	2000
55	AC30226	China	Melón	2000
56	AC30228	China	Melón	2000
57	AC30229	China	Melón	2000
58	AC30231	China	Melón	2000
59	AC30235	China	Melón	2000
60	AC30237	China	Melón	2000
61	AC30238	China	Melón	2000
62	AC30240	China	Melón	2000
63	AC30243	China	Melón	2000
64	AC30248	China	Desc.	2001
65	AC30249	China	Desc.	2001
66	AC30250	China	Melón	2000
67	AC30251	China	Melón	2000

---

Cont. Tabla 2.9

---

68	AC30254	China	Melón	2000
69	AC30287	China	Melón	2000
70	AC30288	China	Sandía	2000
71	AC30289	China	Melón	2000
72	AC30290	EEUU	Melón	2006
73	AC30291	EEUU	Melón	2000
74	AC30292	EEUU	Melón	2000
75	AC30293	China	Sandía	2000
76	AC30294	China	Sandía	2000
77	AAA30296	Japón	Arroz	-
78	AAA30297	Japón	Arroz	-
79	AAA30298	Japón	Arroz	-
80	AAA30305	EEUU	Vasey Grass	1997
81	AC30353	China	Sandía	2004
82	AC30354	China	Sandía	2004
83	AC30355	China	Sandía	2004
84	AC30356	China	Sandía	2004
85	AC30357	China	Sandía	2004
86	AC30358	China	Sandía	2004
87	AC30359	China	Sandía	2004
88	AC30360	China	Sandía	2004
89	AC30361	China	Sandía	2003
90	AC30362	China	Sandía	2003
91	AC30363	China	Sandía	2003
92	AC30364	China	Sandía	2003
93	AC30365	China	Sandía	2003
94	AC30366	China	Sandía	2003
95	AC30367	China	Melón	2005
96	AC30370	China	Sandía	2005
97	AC30371	China	Sandía	2005
98	AC30372	China	Sandía	2004
99	AC30373	China	Melón	2000
100	AC30374	EEUU	Sandía	2007
101	AC30375	EEUU	Sandía	2007

---

Cont. Tabla 2.9

102	AC30376	China	Melón	2007
103	AC30377	Turquía	Sandía	2007
104	AC30378	China	Sandía	2005
105	AC30379	China	Melón	2000
106	AC30380	China	Desc.	2004
107	AC30381	China	Sandía	2004
108	AC30382	EEUU	Melón	1978
109	AC30383	EEUU	Sandía	1978
110	AC30384	EEUU	Sandía	1978
111	AC30385	EEUU	Sandía	1978
112	AC_M1	Israel	Melón	2000
113	AC_M6	Israel	Melón	2002
114	AC_W1	Israel	Sandía	2002
115	AC_W2	Israel	Sandía	2003
116	AC_W4	Israel	Sandía	2002
117	AC_W6	Israel	Sandía	2001
118	AO19882	EEUU	Arroz	2014

Nota: \*Las letras junto al ID de las cepas representan la provincia de procedencia: Salta (S), Santa Fe (SF), Misiones (M) and Tucumán (T). Por ejemplo, SF20\_1 representa la cepa número 1 aislada de la muestra 20 (variedad INTA CP 98-828) de Santa Fe. Las cepas N° 1 (Salta) -12-13-14- y 15 (Tucumán) se tomaron de Fontana et al. (2013).

### II.1.3.2.2. Análisis de datos MLST

La técnica MLST consiste en la amplificación por PCR seguida de la secuenciación del ADN y posterior análisis bioinformático. Se describe a continuación, de manera esquemática, el procedimiento seguido para cada etapa:

-Constatar calidad de las secuencias: los productos obtenidos por PCR se secuenciaron en sentido positivo y reverso para obtener mayor y mejor calidad en la secuencia.

-Verificar identidad con los genes de referencia: Cada secuencia fue verificada en cuanto a su identidad con el gen de referencia por comparación usando el programa Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/NCBI/EEUU](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/NCBI/EEUU)), con secuencias depositadas en el banco de datos del Genbank.

-Realizar el ensamblaje de secuencias *forward* y *reverse* para obtener la secuencia consenso definitiva. Las secuencias y sus respectivos cromatogramas se visualizaron con el software BioEdit v.7.0.5.3, realizando un exhaustiva “limpieza” y corrección de nucleótidos asignados como NNN y eliminando “gaps” cuando fuese necesario. Luego, con las secuencias ya verificadas se realizó el “ensamblaje” para obtener una secuencia consenso única.

-Realizar los alineamientos de las secuencias para cada gen de cada cepa con las secuencias de referencia de la base de datos. Una vez generadas las secuencias consenso para cada cepa y para cada gen, se alinearon con MEGA7.0.26 (<http://www.megasoftware.net/>); En este alineamiento además de las secuencias de cepas propias obtenidas en este trabajo de tesis, se incorporaron todas las secuencias indicadas en la Tabla 2.9

-Determinar los Tipo de Secuencia (ST); los perfiles alélicos para cada cepa se calcularon usando el software MLSTest (Tomasini et al., 2013). En base a las combinaciones de los perfiles alélicos, se asignó el (ST a cada cepa)

-Análisis de datos; Se realizó un análisis BURST (Feil et al., 2004) utilizando MLSTest para identificar complejos clonales con una definición grupal de al menos seis alelos compartidos (Tomasini et al., 2013). Además, se usó MLSTest para construir un árbol de Neighbor-joining (NJ), con diferentes medidas de soporte de nodos. Se construyeron árboles de consenso que resumen la información de los árboles de fragmentos individuales (basados en la frecuencia de las ramas en el árbol NJ para cada locus). Los diagramas de escala multidimensionales se crearon a partir de matrices de distancia por pares. La incongruencia topológica entre los locus y las redes de consenso se calcularon mediante MLSTest para estimar la recombinación en las especies de *Acidovorax* y la significación estadística se abordó mediante la prueba de Templeton (Tomasini et al., 2013).

#### **II.1.4. Secuenciación de genoma de *A. avenae* T10\_61**

La cepa T10\_61 se aisló de hojas con síntomas típicos de estría roja en caña de azúcar en la provincia de Tucumán de la variedad INTA NA 89-686 inscrita recientemente por INTA y de amplia difusión en la región cañera del Ingenio

Tabacal en Salta. El ADN genómico se obtuvo de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado II.1.2.5.1 de Materiales y Métodos. Se cuantificó en Qubit para determinar su concentración en base a las indicaciones requeridas para la secuenciación.

El secuenciamiento se realizó utilizando la Plataforma Illumina de la Universidad de Verona (Italia), en el marco de una colaboración con el Istituto di Microbiologia-Centro di Ricerche Biotecnologiche (CRB), Università Cattolica del Sacro Cuore, Cremona (Italia). Las lecturas fueron ensambladas utilizando el software Velvet (versión 1.1.04). Para la anotación del genoma se utilizó el servidor RAST (<http://rast.theseed.org/FIG/rast.cgi>) que permite visualizar y analizar la distribución y número de genes en diferentes subsistemas presentes. Posteriormente la secuencia genómica se depositó en la base de datos mundial GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para su registro y posterior asignación del número de acceso.

#### II.1.4.1. Estudios genómicos comparativos

Con el fin de establecer relaciones filogenéticas entre las distintas especies de *Acidovorax* fitopatógenas, se realizaron estudios comparativos con los genomas disponibles en la base de datos y el genoma de la cepa *Acidovorax avenae* T10\_61 de caña de azúcar, obtenido en el presente estudio (Tabla 2.10). Para llevar a cabo el análisis propuesto se implementó **panX** (Ding et al., 2016) que consiste en un paquete de software para análisis integrales de pan-genomas. Es importante mencionar que el pan genoma (o supragenoma) hace referencia a la unión de todos los genes encontrados en un grupo de cepas (por ejemplo, cepas de una especie) y que resulta ser típicamente varias veces más grandes que el “core genoma” o genoma núcleo (Ding et al., 2016). El **panX** permite la visualización interactiva en la web y una exploración dinámica de los genomas.

La aplicación web (<http://pangenome.tuebingen.mpg.de/>) abarca varios paneles interconectados (gráficos estadísticos pangénomicos, tabla de *clusters* de genes, alineación, filogenias comparativas, tabla de metadatos). Los *clusters* de genes se pueden buscar y filtrar rápidamente por nombre de genes, anotación,

duplicación y sus propiedades filogenéticas, como la diversidad o el número de eventos de ganancia / pérdida de genes (Ding et al., 2016).

En la Tabla 2.10 se mencionan los genomas incorporados al análisis, donde además se detalla, el origen geográfico de los aislamientos y el hospedante del cual fueron obtenidos en cada caso.

**Tabla 2.10.** Genomas de *Acidovorax* sp. analizados

<b>Especie</b>	<b>Cepa</b>	<b>N° de acceso</b>	<b>Huésped</b>	<b>Origen Geográfico</b>
<i>A. avenae</i>	T10_61	NZ_LJGO00000000.1	Caña de azúcar	Argentina
<i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	ATCC 19860	NC_015138.1	Maíz	EEUU
<i>A. avenae</i> subsp. <i>avenae</i>	RS-1	NZ_AFPT00000000.1	Arroz	China
<i>A. oryzae</i>	ATCC 19882	NZ_JMKU00000000.1	Arroz	Japón
<i>A. avenae</i> subsp. <i>cattleyae</i>	DSM 17101	NZ_FNJL00000000.	<i>Cattleya</i> sp.	EEUU
<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	AAC00-1	NC_008752.1	Sandía	EEUU
<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	KACC17005	NZ_CP023687.1	Sandía	Corea
<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	DSM17060	NZ_FNEY00000000.1	Sandía	EEUU
<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	TW6	NZ_JXDJ00000000.1	Sandía	China
<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	pslb65	NZ_JYHM00000000.1	Melón	China
<i>A. avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	M6	NZ_LKUW00000000.1	Melón	Israel

## II.1.5. Ensayos de virulencia

Las pruebas de virulencia, para evaluar los diferentes grados de severidad y/o agresividad se realizaron empleando las cepas de *A. avenae* T10\_61, S11\_3, S22\_3, SF17\_4 y SF18\_1 tipificadas como ST diferentes luego del análisis MLST. La cepa T10\_61 se consideró además como control positivo (Fontana et al., 2013). Plantines jóvenes de caña de azúcar de la variedad susceptible TucCP 77-42, (Rago et al., 2008) de aproximadamente un mes de emergencia se colocaron en macetas con tierra y mantillo en una proporción 70/30 (Fig.2.2 A y B). Un total de 20 plantines (replicas biológicas) se utilizaron para cada tratamiento (o para cada cepa) y el experimento se llevó a cabo en una única vez con un diseño completamente aleatorizado. Los ensayos se realizaron en invernáculo controlando las condiciones de temperatura (25°-30°C) y humedad elevadas. Para la inoculación se siguió el procedimiento descrito por Jones et al. (2001), modificado para caña de azúcar (Fontana et al., 2013). Se utilizó como inóculo una suspensión  $1 \times 10^8$  UFC/ml a la cual se añadió Carburo de Silicio (carburundum) 500 mesh (como agente abrasivo) y tween 20 (como tensoactivo). El inóculo se preparó a partir de un cultivo puro de la bacteria crecido en medio líquido LB a 30°C y con agitación durante 48 h. Las hojas se frotaron manualmente con esta suspensión. Posteriormente se cubrieron con una bolsa de nylon durante 72 h para mantener elevada la humedad relativa (HR) del ambiente, promoviendo la condensación de agua sobre las hojas para favorecer la infección (Fig.2.2 C).

Las plantas se examinaron en busca de síntomas todos los días y hasta 10 días después de la inoculación, con los plantines ubicados luego de 72 h en sombráculo (Fig. 2.2 D) para determinar la evolución de los mismos. La aparición de estrías rojas en las hojas se denominó "síntomas típicos" (estrías localizadas a menudo extendidas hasta la tercera hoja) y "síntomas severos" cuando se veía afectado el brote apical, estableciéndose una escala de valor del 0 al 4 en base a la escala descrita por Fontana (2010) y Rago (2005) con modificaciones para una mejor adecuación a las características de la enfermedad (Tabla 2.11). Los datos de

severidad se tomaron el día 10 posterior a la inoculación y se utilizaron para calcular una severidad media para cada planta. Se realizó un análisis estadístico de varianza (ANOVA) con el software InfoStat (Di Renzo et al., 2018).

Una vez concluido el período de observación, se conservaron las hojas de los plantines inoculados, en heladera entre 4° y 7°C para ser empleados en los re-aislamientos, complementando así los ensayos de patogenicidad. Para ello se procedió de la misma manera que en los aislamientos generales tal como se describió en el apartado II.1.2. de este capítulo.

**Tabla 2.11:** Escala de valor para evaluación de severidad de estría roja, causados por *Acidovorax avenae*.

<b>Escala</b>	<b>Síntomas</b>
0	Sin síntomas
1	Infección localizada y menos de 3 estrías por hoja
2	Infección avanzada y más de 3 estrías por hoja
3	Infección severa que alcanza el brote apical (o brote guía)
4	Podredumbre y/o muerte del brote apical



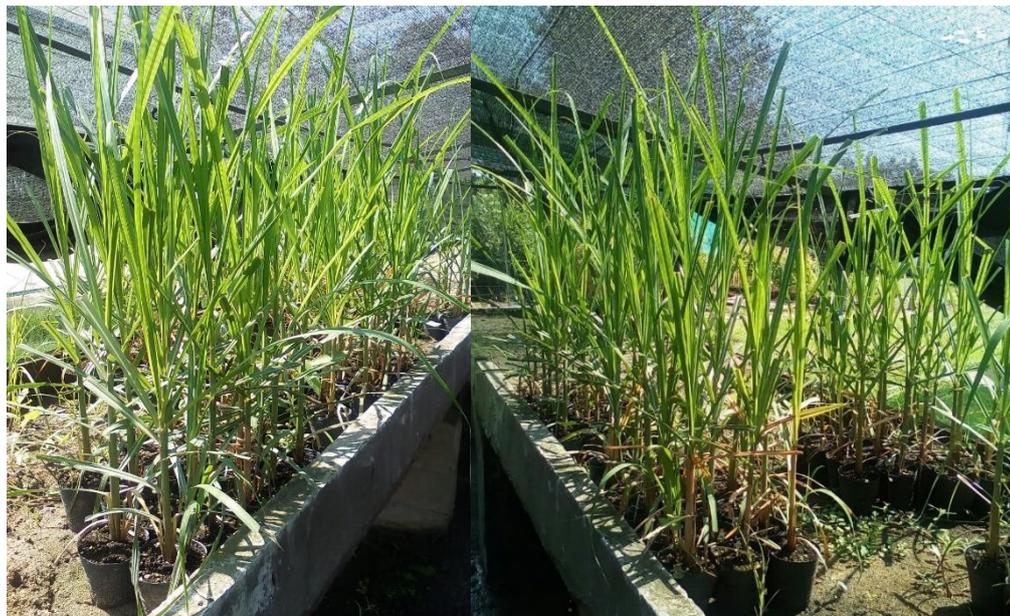
A



B



C



D

**Fig. 2.2:** A y B: Inoculaciones en plantines jóvenes de caña de azúcar C: Plantines en cámara húmeda; D: plantines en sombráculo después de 72 h de inoculación.

## **II.2. Caracterización de la microbiota principal en el patosistema en estudio**

### **II.2.1. Muestreo**

Para la estimación de la composición microbiana principal en el sistema en estudio, se realizó un muestreo en un lote seleccionado por sus antecedentes de alta presión de inóculo (elevada incidencia de estría roja) y con rotación con soja, en el noreste de la Provincia de Tucumán, en la localidad de La Ramada, Departamento Burruyacú. Esta localidad se encuentra ubicada en la región agroecológica denominada Llanura Chaco Pampeana Subhúmeda- Húmeda que se extiende al NE del Departamento Capital, ocupando el 3,6% del territorio provincial. Presenta relieve ondulado (colinas suaves), con suelos de textura franco-limosa, precipitación media anual de 750 a 1000 mm, evapotranspiración (ETP) de 900 a 950, deficiencia de agua moderada a nula, temperatura media anual 19° C (enero = 24°C; julio = 12,5°C). frecuencia de heladas: 12 por año (junio a agosto). La actividad agrícola es dominante en los últimos treinta años, además tiene una importante aptitud ganadera, tampera y forestal.

El lote, cedido gentilmente para el estudio por Finca Don Candela (Ingenio la Florida), cuenta con 4953 surcos de caña de azúcar, edad del cultivo soca 1 (corresponde al rebrote luego del primer corte), cultivo antecesor soja. Para el muestreo se seleccionaron las variedades comerciales Tuc CP 77-42 (357 surcos) y LCP 85-384 (3866 surcos), susceptible y tolerante respectivamente (GS y GT en adelante) frente a estría roja. Durante dos campañas consecutivas, 2013-2014 y 2014-2015, se tomaron, por duplicado y en dos puntos dentro del surco, muestras de suelo y hojas a los 30, 90 y 180 días después de cosecha (ddc), que coincide con el período de aparición de síntomas de la enfermedad desde la brotación (Tabla 2.12). El suelo, a granel, se extrajo con barreno tipo sacabocado de la zona en íntimo contacto con las raíces de caña (suelo rizoférico) y las hojas se cortaron de la parte aérea de la misma planta donde se colocaba el barrero. Las muestras se acondicionaron en bolsas plásticas tipo "ziploc" para su conservación hasta el momento de ser procesadas. Adicionalmente, se fraccionaron en tubos tipo eppendorf (el suelo) y en sobres papel (las hojas) y se colocó una fracción a -20°C y otra a -70°C para su conservación a mayor plazo.

Cabe mencionar que a los fines de tener un control “fuera de tipo” o de contraste con el sistema en estudio, se tomó por única vez en el último muestreo de 2015, una muestra de suelo de un sistema de monocultivo con caña de azúcar de más de 20 años ininterrumpidos, con las dos variedades en estudio presentes. La Finca se denomina Los Lapachos, en la misma localidad de La Ramada a pocos kilómetros de la finca Don Candela, ambas bajo el mismo manejo de Ingenio La Florida.

### **II.2.2. Extracción de ADN Total**

El ADN total de suelo y/u hojas se obtuvo usando FastDNA™ Spin Kit for Soil y FastDNA® Spin kit for plant and animal tissues de MP Biomedicals en cada caso. El ADN bacteriano total se extrajo de 300 g de suelo, mientras que para el caso de hojas se empleó 150 g para cada muestra. Cabe mencionar, que las muestras de hojas utilizadas para este ensayo, solo corresponden al primer muestreo del ciclo 2013-2014, ya que por una cuestión de tiempo y costo se decidió continuar posteriormente sólo con las muestras de suelo en los análisis, tanto de DGGE como de metagenómica. En ambos casos se siguió el procedimiento basado en tecnología de perlas y el instrumento FastPrep® (Qbiogene, Inc., CA) que consiste en una ruptura mecánica del material utilizando Lysing Matrix D (perlas de cerámica de 1,4 mm) para la lisis celular y un método de filtro de spin basado en sílice para el proceso de purificación. El ADN fue finalmente resuspendido en 100 µl de solución provista por el kit. Los ácidos nucleicos extraídos se examinaron con una electroforesis al 0,8% gel de agarosa, y cuantificado utilizando el método picogreen del Kit de ensayo Quant-iT™ HS ds-DNA (Invitrogen, Paisley, RU) en combinación con el fluorómetro QuBit™. A partir del ADN total obtenido se ensayaron diferentes condiciones de amplificación y corridas para la técnica de DGGE y posteriormente para un análisis metagenómico.

**Tabla 2.12:** Muestras analizadas en los métodos independientes de cultivo.

ID Muestras	Nombre Muestra	Fecha	Tiempo de muestreo	Sistema de manejo	Lugar
S64	GTIA*	oct-13	30 ddc	soca 1 caña-soja	Finca Don Candela
S66	GTIA*	oct-13	30 ddc	soca 1 caña-soja	Finca Don Candela
S65	GTIIA*	oct-13	30 ddc	soca 1 caña-soja	Finca Don Candela
S67	GTIIA*	oct-13	30 ddc	soca 1 caña-soja	Finca Don Candela
S62	GTIB	dic-13	90 ddc	soca 1 caña-soja	Finca Don Candela
S63	GTIIB	dic-13	90 ddc	soca 1 caña-soja	Finca Don Candela
S58	GTIC	mar-14	180 ddc	soca 1 caña-soja	Finca Don Candela
S59	GTIIC	mar-14	180 ddc	soca 1 caña-soja	Finca Don Candela
S74	GTID	nov-14	30 ddc	soca 2 caña-soja	Finca Don Candela
S77	GTIID	nov-14	30 ddc	soca 2 caña-soja	Finca Don Candela
S72	GTIE	ene-15	90 ddc	soca 2 caña-soja	Finca Don Candela
S75	GTIIE	ene-15	90 ddc	soca 2 caña-soja	Finca Don Candela
S73	GTIF	mayo-15	180 ddc	soca 2 caña-soja	Finca Don Candela
S76	GTIIF	mayo-15	180 ddc	soca 2 caña-soja	Finca Don Candela
S85	GTUG	mayo-15	180 ddc	soca caña-caña	Finca Los Lapachos
S68	GSIA*	oct-13	30 ddc	soca 1 caña-soja	Finca Don Candela
S70	GSIA*	oct-13	30 ddc	soca 1 caña-soja	Finca Don Candela
S69	GSIIA*	oct-13	30 ddc	soca 1 caña-soja	Finca Don Candela
S71	GSIIA*	oct-13	30 ddc	soca 1 caña-soja	Finca Don Candela
S60	GSIB	dic-13	90 ddc	soca 1 caña-soja	Finca Don Candela
S61	GSIIB	dic-13	90 ddc	soca 1 caña-soja	Finca Don Candela
S56	GSIC	mar-14	180 ddc	soca 1 caña-soja	Finca Don Candela
S57	GSIIC	mar-14	180 ddc	soca 1 caña-soja	Finca Don Candela
S80	GSID	nov-14	30 ddc	soca 2 caña-soja	Finca Don Candela
S83	GSIID	nov-14	30 ddc	soca 2 caña-soja	Finca Don Candela
S78	GSIE	ene-15	90 ddc	soca 2 caña-soja	Finca Don Candela
S81	GSIIE	ene-15	90 ddc	soca 2 caña-soja	Finca Don Candela
S79	GSIF	mayo-15	180 ddc	soca 2 caña-soja	Finca Don Candela
S82	GSIIF	mayo-15	180 ddc	soca 2 caña-soja	Finca Don Candela
S84	GSUG	mayo-15	180 ddc	soca caña-caña	Finca Los Lapachos

Nota: GT genotipo tolerante; GS genotipo susceptible

I muestra 1; II muestra 2, A, B, C, D, E, y F, tratamientos expresados en días después de cosecha (ddc) ciclo 2013-2014 y 2014-2015 consecutivamente. UG: caña sobre caña (muestra única)

\*muestras a partir de las cuales se extrajo ADN total de hoja y ADN total de suelo.

### II.2.3. Electroforesis con gradientes desnaturizantes químicos DGGE

A partir del ADN total obtenido de suelo y planta se realizaron los ensayos DGGE a fin de estimar la composición microbiana del sistema en estudio.

Para el desarrollo de la técnica se utilizaron las siguientes soluciones y reactivos. Otros insumos como tampones o *buffers* fueron descritos en el apartado II. 1.2.4.1 de este capítulo:

#### 1-Solución de Acrilamida 40%/Bis (37.5:1)

Componentes	Concentración final
Acrilamida	38,93 g
Bis-acrilamida	1,07 g
H <sub>2</sub> O dest csp	1 l

Se esterilizó por filtración (Millipore 0,45 µm) y se almacenó a 4°C.

#### 2-Solución libre de Urea/Formamida (0% desnaturizante)

Componentes	Concentración final	
40% Acrilamida/Bis (37.5:1)	20 ml	8%
50x TAE buffer	2 ml	1x
H <sub>2</sub> O dest csp	100 ml	

#### 3-Soluciones desnaturizantes de Urea/Formamida

Componentes	30%	40%	50%	60%	70%
40% Acrilamida/Bis (37.5:1)	20 ml				
50x TAE buffer	2 ml				
Formamida (desionizada)	12 ml	16 ml	20 ml	24 ml	28 ml
Urea	12,6 g	16,8 g	21 g	25,2 g	29,4
H <sub>2</sub> O dest csp	100 ml				

#### 4-Solución de persulfato de amonio 10% (PSA)

Disolver 0,1 g de amonio persulfato en 10 ml de H<sub>2</sub>O dest., conservar a - 20°C.

### 5-Reactivo “solución Dye”

Usado como indicador de gradiente en geles de electroforesis desnaturalizantes. Se adiciona a la solución de mayor concentración de agentes desnaturalizantes.

<b>Componentes</b>		<b>Concentración final</b>
Azul de Bromo fenol	0,05 g	0,5 %
Xylene Cyanol	0,05 g	0,5%
1x TAE buffer csp	10,0 ml	1x

### 6-2x Gel loading Dye

Colorante usado para la siembra en el gel, otorga densidad y permite visualizar el frente de corrida durante la electroforesis.

<b>Componentes</b>		<b>Concentración final</b>
2% Bromo azul de bromo fenol	0,25 ml	0,05%
2% Xylene Cyanol	0,25 ml	0,05%
100% Glicerol	7,0 ml	70%
H <sub>2</sub> O dest csp	2,5 ml	

El procedimiento empleado se describe a continuación:

-Extracción y purificación del ADN directamente de las muestras de suelo y/u hojas.

-Amplificación mediante PCR de las regiones variables del gen ribosomal 16S seleccionadas de acuerdo al grupo de microorganismos que se desea estudiar. Se usan desde cebadores universales hasta cebadores muy específicos de especie. En este trabajo se estudiaron 3 diferentes regiones variables usando los cebadores y las combinaciones de los mismos descritos en la Tabla 2.13 y 2.14 respectivamente.

-Electroforesis en gel de agarosa para controlar el producto de PCR y su concentración aproximada.

-Preparación del gel de poliacrilamida (37,5:1; acrilamida:bisacrilamida) en TAE 1x. Anteriormente se describió en detalle los reactivos y cantidades necesarias para la preparación del gel para DGGE con la concentración adecuada de agentes desnaturalizantes. La concentración de acrilamida en el gel se selecciona de acuerdo al tamaño de los fragmentos a amplificar:

Porcentaje del gel	Fragmento amplificado
6%	300-1000 pb
8%	200-400 pb
10%	100-300 pb

-En este trabajo los geles fueron preparados con una concentración final de poliacrilamida del 8%, con dimensiones de 280 x 180 x 1 mm y con un volumen final de aproximadamente 50 ml. Los gradientes desnaturizantes que se usaron fueron paralelos al frente de corrida. El equipo usado para esta electroforesis fue un Sistema DGGE INGENY phorU-2 (Ingeny International BV, Países Bajos)

-Una vez listas las soluciones de poliacrilamida ambas se van mezclando con ayuda de una bomba que luego las impulsa dentro de los vidrios. Se deja polimerizar al menos dos horas. Se puede observar la correcta formación del gradiente ya que la solución de alta concentración desnaturizante (High) es coloreada, mientras que la de baja concentración (Low) no, por lo tanto, se evidencia un gradiente de color azul. A cada solución se añade:

-500 µl de solución Dye (sólo en la solución de alta concentración desnaturizante)

-5 µl de Temed y 150 µl de PSA 10% en ambas soluciones

(Nota: se modificaron las concentraciones de Temed y PSA de acuerdo al clima, el frío favorece la polimerización. La solución stock preparada en exceso se conservó a 4°C, al abrigo de la luz).

-Preparar 17 litros de TAE 1x y precalentarlo a 60°C al menos 1 hora. Cuando el buffer alcanzó la temperatura y el gel ha polimerizado, introducir el soporte con el o los geles entre los vidrios (pueden correr simultáneamente dos geles) y calentar a 60°C al menos por 45' antes de sembrar las muestras e iniciar la electroforesis.

-Preparación de las muestras a sembrar: a 10 µl de ADN obtenido mediante PCR se le adicionó igual volumen del colorante de corrida Gel Loading Dye 2x y se sembraron en los pocillos previamente lavados con el mismo buffer para eliminar restos de acrilamida que puedan haber quedado dentro al quitar los peines.

-La corrida se realizó durante 16 h a un voltaje constante de 90 V.

-Coloración del gel: colocar 200 ml de TAE 1x, agregar 20 µl de colorante Syber green y dejar colorear por un término mínimo de 10-15 min.

### II.2.3.1 Optimización del protocolo de DGGE

Se ensayaron diversas condiciones en los experimentos de PCR para el posterior análisis por DGGE. El protocolo, descrito por Fontana et al. (2005b) fue aplicado para tres combinaciones de cebadores, con las siguientes concentraciones de reactivos en las mezclas de PCR: tampón de PCR (1x); MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM); dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (200 µM c/u); cebador (0,1 µM c/u); Taq ADN polimerasa (0,1 U/ µl); ADN muestra (15-20 ng) y agua bidestilada estéril (csp 50 µl). Las Tablas 2.13 y 2.14 muestra los cebadores y las combinaciones ensayadas respectivamente.

La reacción de amplificación consistió en 35 ciclos a: 94°C 30'', 58°C 30'', 72°C 1'. Para cada región variable analizada fue adaptado el gradiente desnaturizante que permitió mejor resolución y separación de las bandas durante la electroforesis.

**Tabla 2.13.** Cebadores evaluados en los experimentos de DGGE.

Cebador	Secuencia	Referencia
<b>Bact-0124 f-GC</b>	CGC CGG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G GGA CGG GTG AGT AAC ACG	Lane, (1991)
<b>Univ-0515 r</b>	ATC GTA TTA CCG CGG CTG CTG CTG GCA	Lane, (1991)
<b>V3 f-GC</b>	CC GGG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG A CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG	Ercolini et al. (2001)
<b>V1f-GC</b>	CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC	Klijn et al. (1991)
<b>V1r</b>	TTC CCC ACG CGTTAC TCA CC	Klijn et al. (1991)

**Tabla 2.14.** Combinaciones de cebadores y productos de amplificación.

<b>Cebadores</b>	<b>Región variable</b>	<b>Producto amplificado</b>
V3f (GC)-Uni 0515r	V3	200 pb
Bact-0124f(GC)-Uni-0515r	V2-V3	400 pb
V1f (GC)-V1r	V1	100 pb

#### **II.2.4. Análisis Metagenómico**

Para implementar el ensayo de metagenómica, se propuso un diseño experimental mediante la amplificación del gen 16S ADN Ribosomal en la plataforma MiSeq, Illumina a partir de las mismas muestras de suelo empleadas para los ensayos de DGGE (Tabla 2.12). Para estudiar la biodiversidad presente se amplificó la región hipervariable V3-V4, a partir del ADN total del suelo, mediante dos reacciones de PCR con cebadores universales del ADNr 16S.

La PCR (anidada) emplea un primer “*forward*” marcado (barcode) para diferenciar las muestras de interés dentro de un “pool” de muestras (Tabla 2.15).

A continuación, se detallan los procedimientos para la secuenciación y el procesamiento de las secuencias:

##### **II.2.4.1. Secuenciación de alto rendimiento (HTS) de amplicones de rRNA 16S**

Treinta muestras de suelo obtenidas en tres tiempos diferentes (Tabla 2.12) fueron seleccionadas para el enfoque HTS. El ADN total bacteriano fue extraído como se describe en el punto II.2.2 de este capítulo. La región variable V3-V4 del 16S rRNA, se amplificó con los pares de cebadores 343F (5'-TACGGRAGGCAGCAG-3') y 802R (5'-TACNVGGGTWTCTAATCC-3') utilizando Phusion Flash High-Fidelity Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham, MA, EE. UU.). Se realizaron dos ciclos de PCR y las condiciones usadas para la mezcla de reacción y los experimentos de amplificación fueron realizados de acuerdo a lo descrito por Vasileiadis et al. (2015). Los productos de la segunda PCR en donde se usa el cebador 343F marcado con un “barcode”

diferente para cada muestra fueron unidos en un solo grupo (pool) en cantidades equimolares basadas en los datos de cuantificación QuBit. El *pool* de productos de PCR fue purificado utilizando el método de fase de inmovilización inversa con el kit Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter, Italia, Milano) y posteriormente secuenciado en PTP - Science Park (Parco Tecnologico Padano, Lodi, Italia) con un instrumento MiSeq Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA) con química V3, que genera lecturas de pares de 300 pb.

**Tabla 2.15:** “Indexed Primers” (barcodes) usados en el estudio

ID muestras	barcode	linker	barcode/linker/primer
57	ATACTCG	TA	ATACTCGTATACGGRAGGCAGCAG
58	ATACGAC	TA	ATACGACTATACGGRAGGCAGCAG
59	ATAGTGC	TA	ATAGTGCTATACGGRAGGCAGCAG
60	CTATCGA	TA	CTATCGATATACGGRAGGCAGCAG
61	CTAGTAG	TA	CTAGTAGTATACGGRAGGCAGCAG
62	CTCTATC	TA	CTCTATCTATACGGRAGGCAGCAG
63	CTCATGT	TA	CTCATGTTATACGGRAGGCAGCAG
64	CTCACTA	TA	CTCACTATATACGGRAGGCAGCAG
65	CTCCATA	TA	CTCCATATATACGGRAGGCAGCAG
66	CTGAACT	TA	CTGAACTTATACGGRAGGCAGCAG
67	CTGCATA	TA	CTGCATATATACGGRAGGCAGCAG
68	CATTGCT	TA	CATTGCTTATACGGRAGGCAGCAG
69	CATAAGC	TA	CATAAGCTATACGGRAGGCAGCAG
70	CATACCA	TA	CATACCATATACGGRAGGCAGCAG
71	CAATCAG	TA	CAATCAGTATACGGRAGGCAGCAG
72	CAGTGTC	TA	CAGTGCTTATACGGRAGGCAGCAG
73	CAACTTG	TA	CAACTTGTATACGGRAGGCAGCAG
74	CAAGTGA	TA	CAAGTGATATACGGRAGGCAGCAG
75	CACAGAT	TA	CACAGATTATACGGRAGGCAGCAG
76	CAGTTAC	TA	CAGTTACTATACGGRAGGCAGCAG
77	CAGGAAT	TA	CAGGAATTATACGGRAGGCAGCAG
78	CCTTCAA	TA	CCTTCAATATACGGRAGGCAGCAG
79	CCTATTG	TA	CCTATTGTATACGGRAGGCAGCAG
80	CCATAGT	TA	CCATAGTTATACGGRAGGCAGCAG

Cont. Tabla 2.15

81	CCAATCT	TA	CCAATCTTATACGGRAGGCAGCAG
82	CGTTAAC	TA	CGTTAACTATACGGRAGGCAGCAG
83	CGTCTTA	TA	CGTCTTATATACGGRAGGCAGCAG
84	CGATTCA	TA	CGATTCATATACGGRAGGCAGCAG
85	CGATATG	TA	CGATATGTATACGGRAGGCAGCAG

#### II.2.4.2. Procesamiento de los datos de secuencia y análisis

El filtrado de datos de secuenciación de alto rendimiento, la multiplexación y la preparación para análisis estadísticos se llevaron a cabo según lo descrito por (Bassi et al., 2015; Połka et al., 2015; Vasileiadis et al., 2015). Se ensamblaron lecturas emparejadas para reconstruir los amplicones V3-V4 completos con el programa "PANDAseq" (Masella et al., 2012) que permite un máximo de dos desajustes y al menos 30 pb de superposición entre los pares de secuencias. La demultiplexación de muestras se llevó a cabo con el kit de herramientas Fastx ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)). Mothur v.1.32.1 (Schloss et al., 2009) se utilizó para eliminar secuencias con grandes homopolímeros ( $\geq 10$ ), secuencias que carecen de alineación dentro de las regiones V3-V4 dirigidas, secuencias quiméricas (Edgar et al., 2011) y secuencias que no se clasificaron como bacterianas después del alineamiento usando Mothur que contiene datos obtenidos desde RDP (Ribosomal Data Project). Los índices de diversidad se calcularon con Mothur.

Los diferentes índices, la riqueza de Chao, y la diversidad de Shannon, así como los índices de uniformidad se calcularon a partir de cada OTU. Todos los análisis estadísticos y por pares, las comparaciones entre grupos se realizaron en R v 3.1.

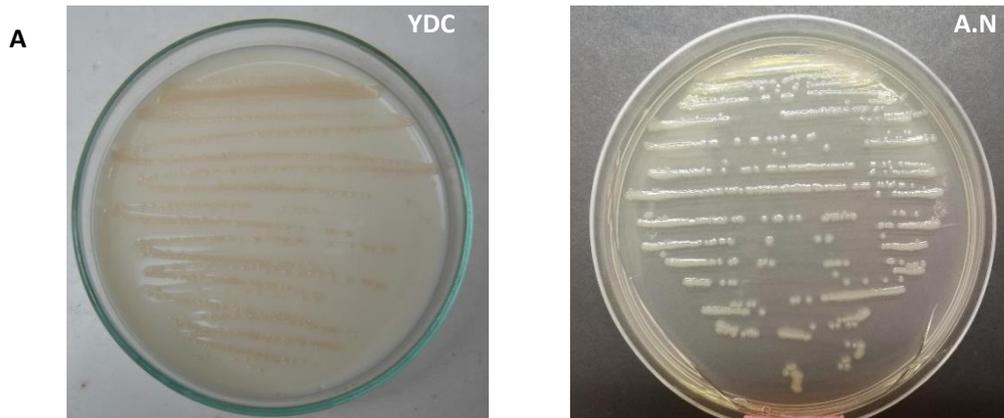


### III.1. Aislamiento e identificación de *Acidovorax avenae*

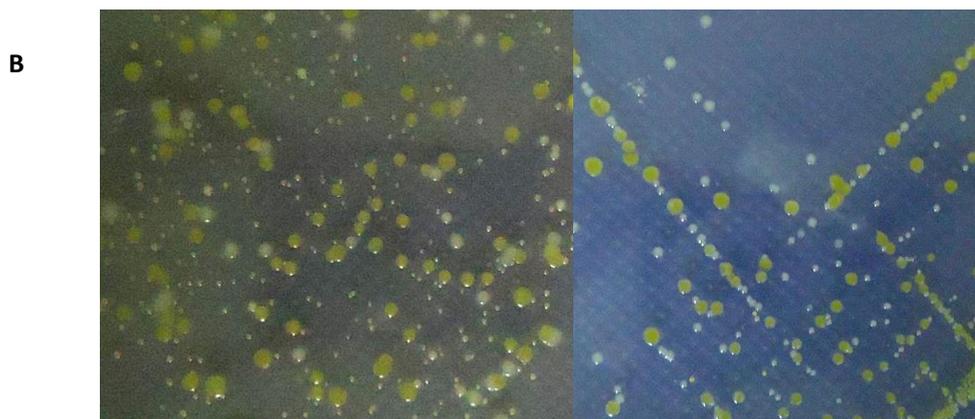
Los medios de cultivo utilizados resultaron efectivos para el aislamiento, bacteriano, tanto el medio general AN, como el medio diferencial YDC exhibieron las colonias típicas esperadas según lo descrito por Jones et al. (2001) y Fontana et al. (2013). Cabe mencionar que no se dispone de un medio totalmente selectivo para *A. avenae* de caña, lo que hace más difícil obtener un buen número de colonias en los aislamientos directos, y en este sentido, es muy importante conocer la morfología de la misma en cada medio de cultivo empleado (Fig.3.1A). La composición en las placas con medio AN, se presentó siempre de la misma manera, se observaron colonias de color blanco-crema, circulares, translúcidas, de bordes lisos, que respondían a la morfología típica de *Acidovorax*. Otras amarillas, circulares, de bordes lisos y uniformes, morfología similar a algunas especies de *Xanthomonas*. Con frecuencia, aunque en pequeño número, se observaron otras colonias blancas, más pequeñas, no cremosas ni translúcidas de consistencia menos blandas (Fig. 3.1B). Las colonias amarillas y las blanco-crema, resultaron muy difíciles de separar en colonias individuales ya que generalmente crecían superpuestas. Luego de sucesivos repiques fueron aisladas y sujetas a diferentes análisis a los fines de identificarlas taxonómicamente. El medio YDC se empleó como medio diferencial para las colonias blanco-crema, presentándose de color beige, característico de *Acidovorax*. Cada colonia pura fue conservada como se describe en el Cap.II (Materiales y Métodos), asegurando así la supervivencia hasta su identificación. Solo las colonias con morfología típica de *Acidovorax* fueron seleccionadas para los posteriores estudios de caracterización molecular, mientras que dos a tres colonias no típicas fueron incluidas como control y para su identificación, para confirmar la presencia o no de otros géneros de bacterias patogénicas, por ejemplo, *Xanthomonas* sp., agente causal de falsa estría roja en Brasil (Giglioti y Matsuoka 2000).

Un total de 100 colonias fueron seleccionadas y caracterizadas en forma preliminar mediante observación microscópica (morfología de la célula), seguida de tinciones de Gram. Esto se realizó principalmente para colonias con morfología típica de *Acidovorax*, 54 colonias aproximadamente (Tabla 3.1) y

algunas colonias amarillas, por los motivos antes mencionados, determinando de este modo, que se trata de bacilos cortos, dispuestos singularmente o en cadenas cortas de a dos y Gram negativos. Las pruebas de movilidad y el test de actividad oxidasa, confirmaron que se trata de bacilos móviles y oxidasa positivos tal como lo describieron previamente para aislados de esta especie, Fontana et al. (2013).



**Fig. 3.1 A.** Colonias de *A. avenae* puras obtenidas sobre placas de Petri en medios de cultivo: Extracto de levadura-dextrosa-carbonato de calcio-YDC; Agar nutritivo-AN



**Fig. 3.1 B.** Colonias obtenidas sobre placas de Petri como resultado de los aislamientos directos en medio de cultivo Agar nutritivo-AN

**Tabla 3.1:** Aislamientos obtenidos según localidad y variedad a partir de hojas con síntomas de estría roja en caña de azúcar.

Variedad	Aislamientos	Año	Localidad-Región	Provincia
Desconocida	F16_1; F16_2, F16_3	2013	El Colorado	Formosa
NA 85-1602	SF17_1, SF17_2, SF17_3, SF17_4, SF17_5, SF17_6, SF17_7, SF17_8 SF17_9, SF17_10	2013	Tacuarendí	Santa Fe
NA 85-1602	SF18_1, SF18_2	2014	Tacuarendí	Santa Fe
Clon Fam 04-1604	SF19_1, SF19_2, SF19_3, SF19_4, SF19_5, SF19_6, SF19_7, SF19_8, SF19_9,	2014	Coop. COET	Santa Fe
INTA CP 98-828	SF20_1, SF20_2, SF20_3, SF20_4, SF20_5, SF20_6, SF20_7	2014	Las Toscas	Santa Fe
Desconocida	SF21_1, SF21_2, SF21_3, SF21_4, SF21_5, SF21_6, SF21_7	2014	Villa Ocampo	Santa Fe
NA 02-2320	S22_1, S22_2, S22_3, S22_4, S22_5,	2014	Tabacal	Salta
Desconocida	M23_1, M23_2, M23_3, M23_4, M23_5, M23_6 M23_7	2014	San Javier	Misiones
NA 96-2929	J24_1, J24_2, J24_3, J24_4, J24_5, J24_6,	2017	Ledesma	Jujuy

**Nota:** la denominación de los aislamientos se compone de la siguiente manera, las letras, hacen referencia a la provincia productora; S: Salta, SF: Santa Fe, M: Misiones, F: Formosa, J: Jujuy; el primer número indica la muestra/variedad (Tabla 2.1 de Mat & Met), y el segundo número indica el número consecutivo asignado a las colonias durante los aislamientos.

## III.2. Caracterización molecular

La caracterización molecular de los aislamientos se realizó mediante PCR especie-específica (PCRee), amplificación del gen ARNr 16S por PCR, RAPD-PCR, y MLST

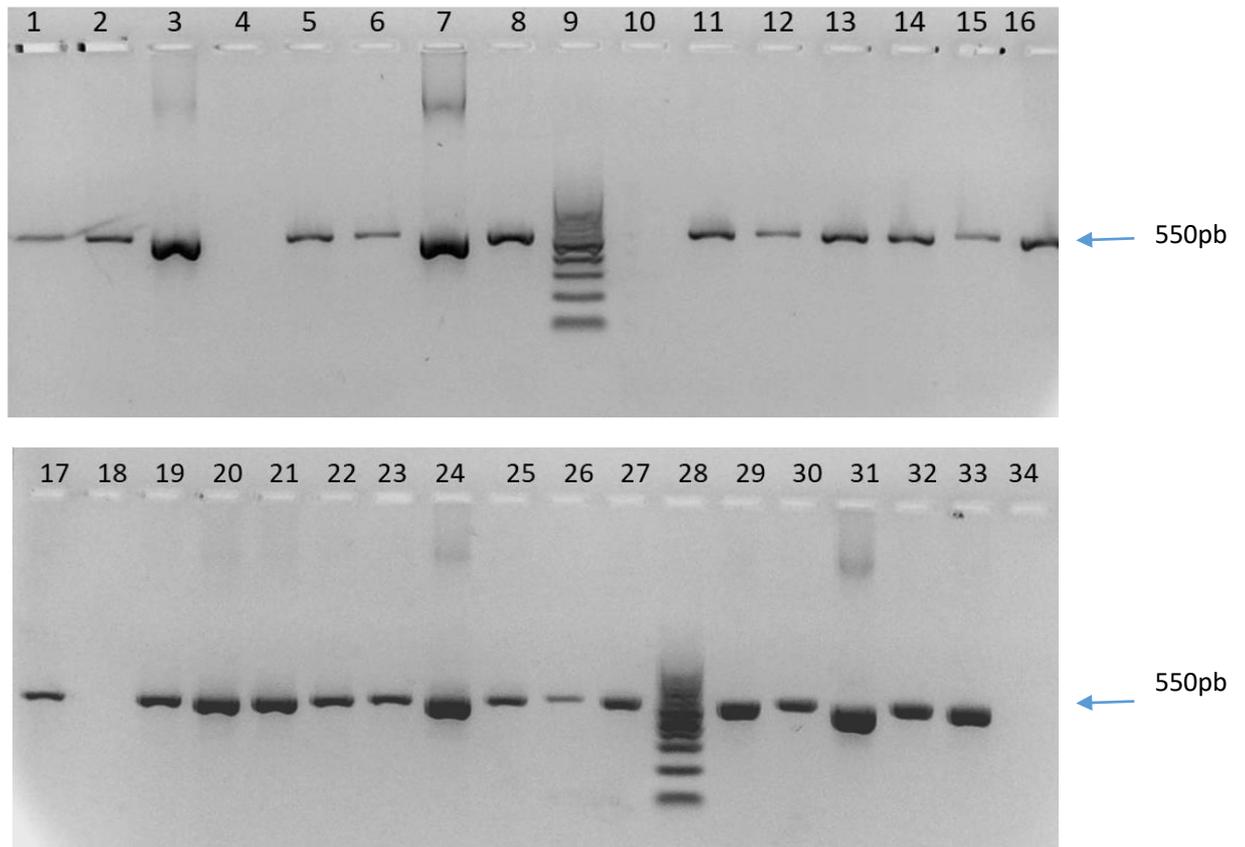
### III.2.1. Extracción de ADN bacteriano

Se ensayaron diferentes protocolos además de kits de extracción rápida, a fin de seleccionar el apropiado para cada caso. En todos los casos se obtuvo ADN de alta pureza y buena concentración que fue usado tanto en las reacciones de PCR especie-específica y en las técnicas de RAPD y MLST para el estudio de la diversidad genética, siendo para estas últimas el más apropiado el obtenido con el método de Ausubel et al. (1992), mientras que los métodos rápidos fueron usados para reacciones PCR especie-específica.

### III.2.2. Identificación de *A. avenae* mediante PCR especie -específica

De las colonias aisladas, identificadas preliminarmente en base a ensayos microbiológicos, aproximadamente un 50% resultaron positiva en la reacción de PCR con cebadores específicos para *Acidovorax avenae* (Fig.3.2), indicando la presencia de otros géneros o especies bacterianas no patogénicas, epífitas y/o saprófitas asociadas a la infección causada por *A. avenae*. Ninguno de los aislamientos de la Provincia de Formosa, resultó PCRee (+). Las cepas PCRee (+), seleccionadas de muestras de las diferentes provincias, y cuyo producto de secuenciamiento se analizó por comparación con Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/NCBI/EEUU](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/NCBI/EEUU)), mostraron una identidad >99% con *Acidovorax*. Algunas colonias no típicas, como las colonias amarillas y algunas blancas, que resultaron PCRee (-), se identificaron mediante amplificación parcial por PCR del gen ARNr 16S (500 pb) o total (1500 pb) empleando el par de cebadores Plb/Mlb y P0/P6, respectivamente. Mediante el análisis de las secuencias obtenidas y por comparación con secuencias presentes

en la base de datos GenBank se encontró más de 99% de identidad con los géneros *Erwinia* y *Pantoea*, respectivamente para ambos tipos de colonias. Tampoco se identificaron cepas como *Xanthomonas* sp. responsable de la falsa estría roja en Brasil. Estos resultados concuerdan con los datos reportados de aislamientos del NOA por Fontana et al. (2013).



**Fig. 3.2** Electroforesis en gel de agarosa (1,2%). PCR especie-específica donde se observa el fragmento de 550 pb amplificado con los cebadores Oaf1/Oar1. Los números sobre las calles corresponde a diferentes aislamientos de *A. avenae*: Santa Fe (2, 3, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 31); Misiones (6, 17, 18, 22, 23, 30) y Salta (1, 4, 10, 19); 9 y 28: Marcador de peso molecular de 100 pb. Columnas sin señal corresponden a aislamientos PCR negativo (4, 10, 18) y control negativo (34).

### III.3. Diversidad genética en aislados de *A. avenae*

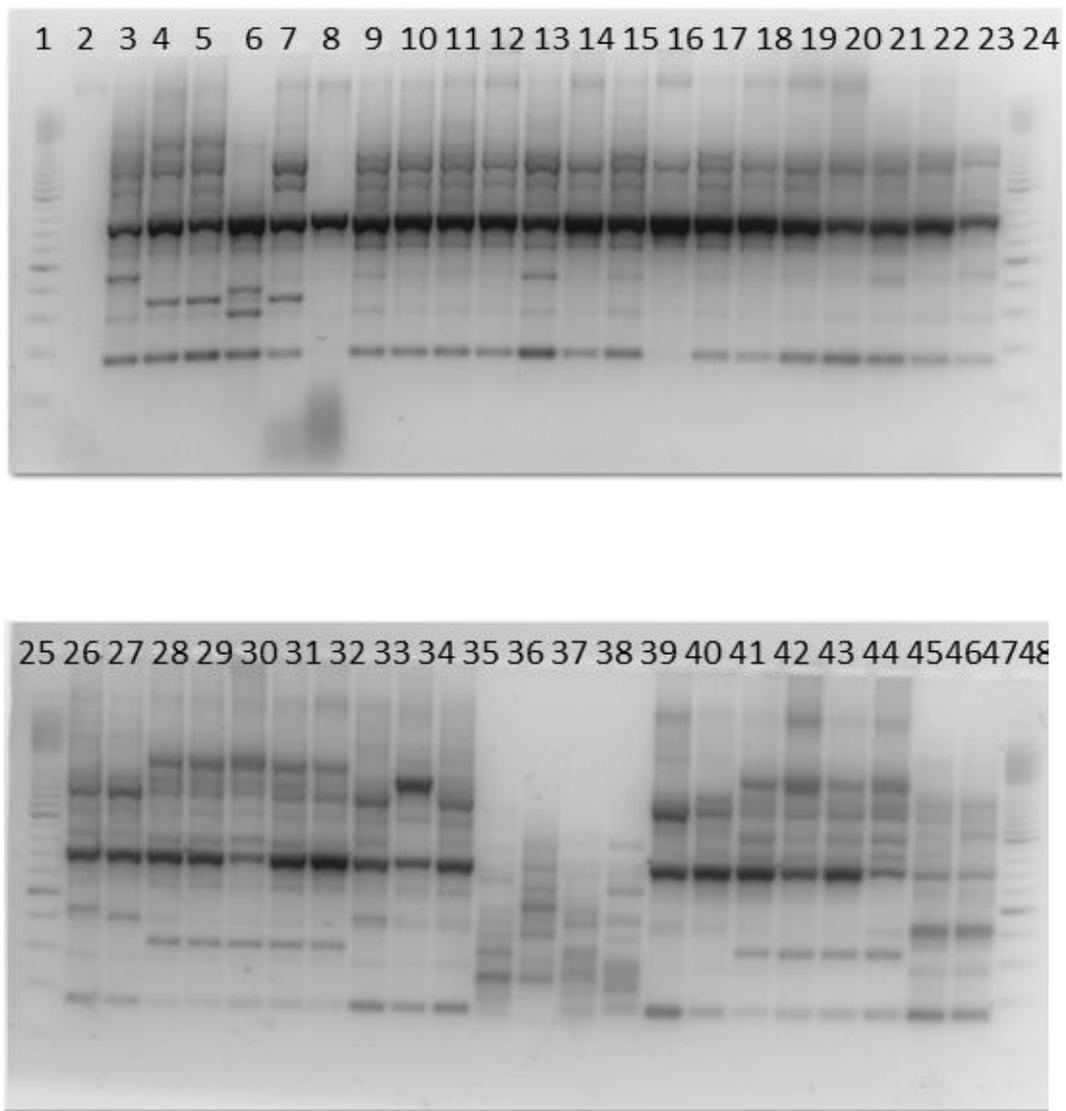
Los aislamientos caracterizados como bacilos móviles, Gram negativos, oxidasa y PCR positivos, fueron analizados mediante RAPD PCR y MLST.

#### III.3.1. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

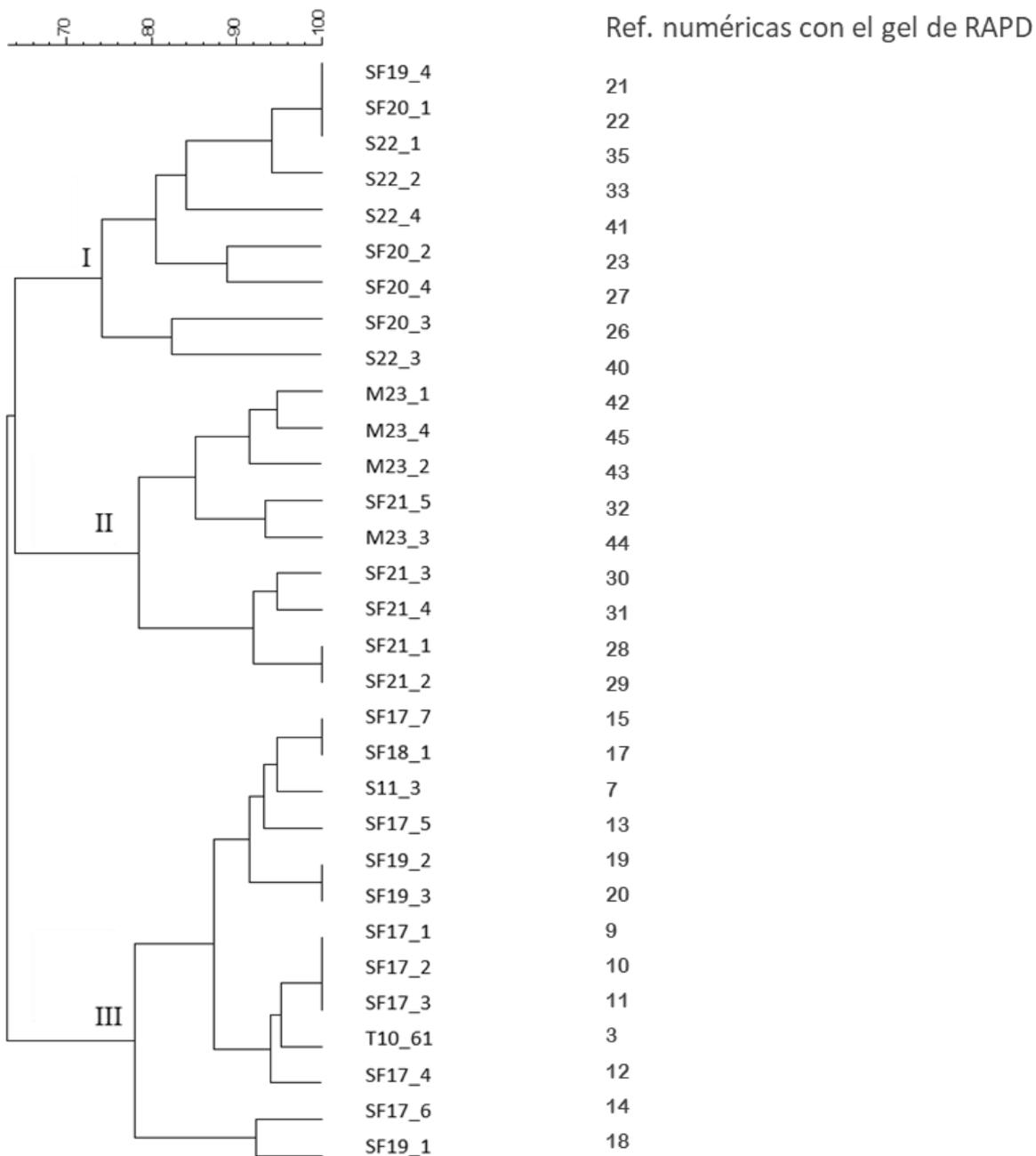
A partir de ADN obtenido de colonias puras se procedió al análisis de los aislamientos mediante RAPD. De los diferentes cebadores ensayados se obtuvieron los mejores resultados con el cebador M13 (Fig. 3.3). Se observó un alto polimorfismo (diferencias en el número de bandas, tamaño del fragmento e intensidad) entre las cepas aisladas de las diferentes regiones cañeras de Argentina. Cuando se analizaron las bandas polimórficas con el software BioNumerics, el dendrograma obtenido con los perfiles RAPD muestra que las cepas de *A. avenae* se agruparon en tres grupos o “clusters” principales a un nivel de similitud > 75%. El grupo I incluye cinco cepas aisladas de las provincias de Santa Fe y cuatro Salta, el grupo II agrupa cuatro cepas de Misiones y cinco de Santa Fe, y los aislados del grupo III incluyen una cepa de Tucumán y una de Salta y 11 cepas de Santa Fe (Fig. 3.3). Respecto al año de muestreo, los grupos I y II solo agruparon aislados obtenidos en 2014, mientras que el grupo III agrupó cepas obtenidas en los años de muestreo 2008, 2013 y 2014. Dado que el número de muestras en la provincia de Santa Fe fue mayor en comparación con las otras provincias (Tabla 2.1), el número de cepas aisladas también fue mayor, y las mismas se ubicaron en los tres grupos de acuerdo con el genotipo de caña de azúcar a partir del cual fueron aislados.

Estos resultados dejan en evidencia que existe una importante diversidad entre y dentro de las provincias, pudiendo existir una adaptabilidad cepa-genotipo de caña, aunque no se puede establecer una clara asociación entre el lugar geográfico y los aislamientos de la bacteria.

Este análisis nos permitió seleccionar los aislados más representativos teniendo en cuenta las regiones de producción y los genotipos de caña de azúcar evaluados para continuar con el análisis MLST.



**Fig.3.3A.** Perfiles RAPD M13 de cepas de *A. avenae* de Salta, Santa Fe, Misiones y Tucumán. Electroforesis en gel de agarosa al 3%. Calles 1; 24; 25 y 48: Marcador 100bp; calles 35 a 38: blancos (o controles negativos).



**Fig. 3.3B.** Dendrograma construido empleando en Programa *Bio Numerics*, con el cebador RAPD M13 para los aislamientos de *Acidovorax* analizados. La matriz de similitud fue calculada utilizando el coeficiente de similitud Dice mientras que el dendrograma fue construido por el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Las letras junto a las cepas indican la provincia de origen: S (Salta); SF (Santa Fe); T (Tucumán); M (Misiones); el primer número hace referencia a la muestra/variedad, el segundo número corresponde al número de aislamiento consecutivo asignado. Por ejemplo, SF 20\_1, corresponde a la cepa número 1 aislada de la muestra número 20 de Santa Fe (INTA NA 98-828).

### III.3.2. MLST (Multilocus sequence typing)

#### III.3.2.1. Amplificación y determinación de la secuencia de genes para MLST

A partir del análisis mediante RAPD fueron seleccionadas diez cepas aisladas entre 2013 y 2014 de diferentes regiones cañeras del NOA y NEA con excepción de Jujuy, cuyos aislamientos fueron posteriores y por cuestiones operativas, de tiempos y costos no se incluyeron en esta etapa. Adicionalmente se incorporaron al análisis cinco cepas previamente identificadas a partir de aislamientos de Tucumán (T10\_61, T6\_50, T4\_53, T8\_45) y de Salta (S11\_3) (Fontana et al., 2013), totalizando 15 cepas tipificadas mediante MLST (Tabla 3.2).

Se analizaron un total de 210 secuencias (105 productos secuenciados en sentido directo y reverso), correspondiente a los siete genes para las quince cepas. Cada secuencia fue analizada por comparación con secuencias depositadas en Genbank, usando Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/NCBI/EEUU](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/NCBI/EEUU)), confirmándose una identidad de >98% con los genes *gmc*, *ugpB*, *pilT*, *lepA*, *trpB*, *gltA* y *phaC* de *Acidovorax avenae*. Las 105 secuencias generadas a partir de este resultado fueron depositadas en la base de datos GenBank bajo el número de acceso MF623064 a MF623168.

#### III.3.2.2. Perfiles Alélicos y “Sequence Type” (ST) o Genotipos multilocus

Los perfiles alélicos asignados usando el software MLSTest se muestran en la Tabla 3.2. Se identificaron cinco ST entre las quince cepas de *A. avenae* aisladas de caña de azúcar, definidos de acuerdo a las combinaciones alélicas encontradas para cada cepa. Ningunos de estos ST fueron descritos hasta el momento en *A. avenae*. La mayoría de las cepas de *A. avenae* de caña de azúcar se tipificaron como ST1 o ST2 (cada ST compuesto por seis cepas), mientras que ST3, ST4 y ST5 son únicos (singletons). Según lo indicado por el análisis de perfiles alélicos, la mayor variabilidad para las cepas de *A. avenae* de caña de azúcar analizadas, correspondió al gen *lepA* (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2:** Perfiles alélicos obtenidos en este estudio mediante análisis MLST.

ST	Cepa	<i>Genes Multilocus</i>							Hospedante	Origen geográfico
		<i>gltA</i>	<i>gmc</i>	<i>lepA</i>	<i>phaC</i>	<i>pilT</i>	<i>trpB</i>	<i>ugpB</i>		
1	S11-3	1	1	1	1	1	1	1	Caña de azúcar	ARGENTINA
1	SF21-2	1	1	1	1	1	1	1	Caña de azúcar	ARGENTINA
1	M23-1	1	1	1	1	1	1	1	Caña de azúcar	ARGENTINA
1	M23-4	1	1	1	1	1	1	1	Caña de azúcar	ARGENTINA
1	T4-53	1	1	1	1	1	1	1	Caña de azúcar	ARGENTINA
1	T6-50	1	1	1	1	1	1	1	Caña de azúcar	ARGENTINA
2	SF17-4	1	1	1	1	2	1	1	Caña de azúcar	ARGENTINA
2	SF17-5	1	1	1	1	2	1	1	Caña de azúcar	ARGENTINA
2	SF19-4	1	1	1	1	2	1	1	Caña de azúcar	ARGENTINA
2	SF20-1	1	1	1	1	2	1	1	Caña de azúcar	ARGENTINA
2	S22-1	1	1	1	1	2	1	1	Caña de azúcar	ARGENTINA
2	T8-45	1	1	1	1	2	1	1	Caña de azúcar	ARGENTINA
3	SF18-1	1	1	2	1	2	1	1	Caña de azúcar	ARGENTINA
4	S22-3	1	1	3	1	2	1	1	Caña de azúcar	ARGENTINA
5	T10-61	1	1	4	1	2	1	1	Caña de azúcar	ARGENTINA
6	AAA19860	2	2	5	1	3	2	2	Maíz	EEUU
7	AC30002	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30042	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	JAPON
7	AC30046	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	NIGERIA
7	AC30073	3	3	6	2	4	3	3	Melón	COREA
7	AC30084	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	Nigeria
7	AC30087	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30091	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30092	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	BRASIL
7	AC30107	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30119	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30120	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30121	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30137	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30139	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30142	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30144	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30146	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30147	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	CHINA
7	AC30248	3	3	6	2	4	3	3	Desc.	CHINA
7	AC30249	3	3	6	2	4	3	3	Desc.	CHINA
7	AC30287	3	3	6	2	4	3	3	Melón	CHINA
7	AC30288	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	JAPON
7	AC30290	3	3	6	2	4	3	3	Melón	CHINA
7	AC30293	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	MALASIA
7	AC30294	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	MALASIA
7	AC30353	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30354	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30355	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30356	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30358	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30372	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30375	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30376	3	3	6	2	4	3	3	Melón	EEUU
7	AC30377	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	EEUU
7	AC30381	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	AUSTRALIA
7	AC_W1	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	AUSTRALIA

ST	Cepa	<i>Genes Multilocus</i>							Hospedante	Origen geográfico
		<i>gltA</i>	<i>gmc</i>	<i>lepA</i>	<i>phaC</i>	<i>pilT</i>	<i>trpB</i>	<i>ugpB</i>		
7	AC_W2	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	BRASIL
7	AC_W4	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	CHINA
7	AC_W6	3	3	6	2	4	3	3	Sandía	CHINA
8	AAA30003	4	4	7	3	5	4	4	Arroz	CHINA
9	AAA30015	5	5	8	4	3	5	5	Arroz	CHINA
10	AAA30044	6	6	9	5	6	6	2	Mijo	CHINA
11	AC30064	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30081	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30082	7	7	6	2	7	3	6	Melón	CHINA
11	AC30118	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30123	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30145	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30148	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30150	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30151	7	7	6	2	7	3	6	Rockmelon	CHINA
11	AC30152	7	7	6	2	7	3	6	Rockmelon	CHINA
11	AC30224	7	7	6	2	7	3	6	Melón	CHINA
11	AC30226	7	7	6	2	7	3	6	Melón	CHINA
11	AC30229	7	7	6	2	7	3	6	Melón	CHINA
11	AC30231	7	7	6	2	7	3	6	Melón	EEUU
11	AC30235	7	7	6	2	7	3	6	Melón	EEUU
11	AC30237	7	7	6	2	7	3	6	Melón	EEUU
11	AC30238	7	7	6	2	7	3	6	Melón	CHINA
11	AC30240	7	7	6	2	7	3	6	Melón	CHINA
11	AC30243	7	7	6	2	7	3	6	Melón	JAPON
11	AC30250	7	7	6	2	7	3	6	Melón	JAPON
11	AC30251	7	7	6	2	7	3	6	Melón	JAPON
11	AC30254	7	7	6	2	7	3	6	Melón	EEUU
11	AC30289	7	7	6	2	7	3	6	Melón	CHINA
11	AC30291	7	7	6	2	7	3	6	Melón	CHINA
11	AC30292	7	7	6	2	7	3	6	Melón	CHINA
11	AC30357	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30359	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30360	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30361	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30362	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30363	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30364	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30365	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30366	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30370	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30371	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30378	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30379	7	7	6	2	7	3	6	Melón	CHINA
11	AC30380	7	7	6	2	7	3	6	Desc.	CHINA
11	AC30382	7	7	6	2	7	3	6	Melón	CHINA
11	AC30383	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	CHINA
11	AC30384	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	EEUU
11	AC30385	7	7	6	2	7	3	6	Sandía	EEUU
11	AC_M1	7	7	6	2	7	3	6	Melón	CHINA
11	AC_M6	7	7	6	2	7	3	6	Melón	TURQUIA
12	AC30080	2	7	6	2	8	3	6	Sandía	CHINA
13	AC30090	8	3	6	2	4	3	3	Sandía	CHINA
14	AC30093	9	3	6	2	4	3	3	Sandía	CHINA

ST	Cepa	Genes Multilocus							Hospedante	Origen geográfico
		<i>gltA</i>	<i>gmc</i>	<i>lepA</i>	<i>phaC</i>	<i>pilT</i>	<i>trpB</i>	<i>ugpB</i>		
15	AC30140	3	3	6	6	4	3	3	Sandía	CHINA
15	AC30143	3	3	6	6	4	3	3	Sandía	EEUU
16	AAA30179	10	8	10	7	9	7	7	Sorgo	EEUU
17	AC30228	3	3	6	8	4	3	3	Melón	EEUU
18	AAA30296	11	9	11	9	10	8	2	Arroz	EEUU
18	AAA30297	11	9	11	9	10	8	2	Arroz	ISRAEL
18	AAA30298	11	9	11	9	10	8	2	Arroz	ISRAEL
19	AAA30305	12	10	12	10	11	3	8	Paspalum sp	ISRAEL
20	AC30367	13	7	6	2	7	3	6	Melón	ISRAEL
21	AC30373	14	7	6	11	7	3	6	Melón	ISRAEL
22	AC30374	15	3	6	2	4	3	3	Sandía	ISRAEL
23	AO19882	16	11	13	3	5	4	4	Arroz	EEUU

Nota: **AAA**: *Acidovorax avenae* subsp *avenae*; **AC**: *Acidovorax avenae* subsp *citrulli*; **AO**: *Acidovorax oryzae*

### III.3.2.3. Complejos clonales en *Acidovorax* sp.

Mediante MLSTest, se realizaron los agrupamientos utilizando los perfiles alélicos con el algoritmo BURST que divide un conjunto de datos MLST de cualquier tamaño en grupos de aislados y complejos clonales relacionados, prediciendo el genotipo fundador (ancestral) de cada complejo clonal y calculando el soporte de bootstrap para la asignación. Cabe recordar que para MLST cada complejo clonal se define como un grupo de genotipos que comparten al menos cinco *loci* con al menos un miembro del grupo, por lo que estos complejos son mutuamente excluyentes (Feil et al., 2004) mientras que “singletons” hace referencia a los aislamientos que no pertenecen a ningún complejo clonal (Odds y Jacobsen 2008).

BURST agrupó las secuencias de las quince cepas de *Acidovorax avenae* de caña de azúcar, en un único complejo clonal, indicando un origen común y cercano para todas ellas (Fig.3.4). Además, se construyó un árbol Neighbor-joining allelic profiles (NJ) con los perfiles alélicos, como otra forma de mostrar estos grupos (Fig.3.5).

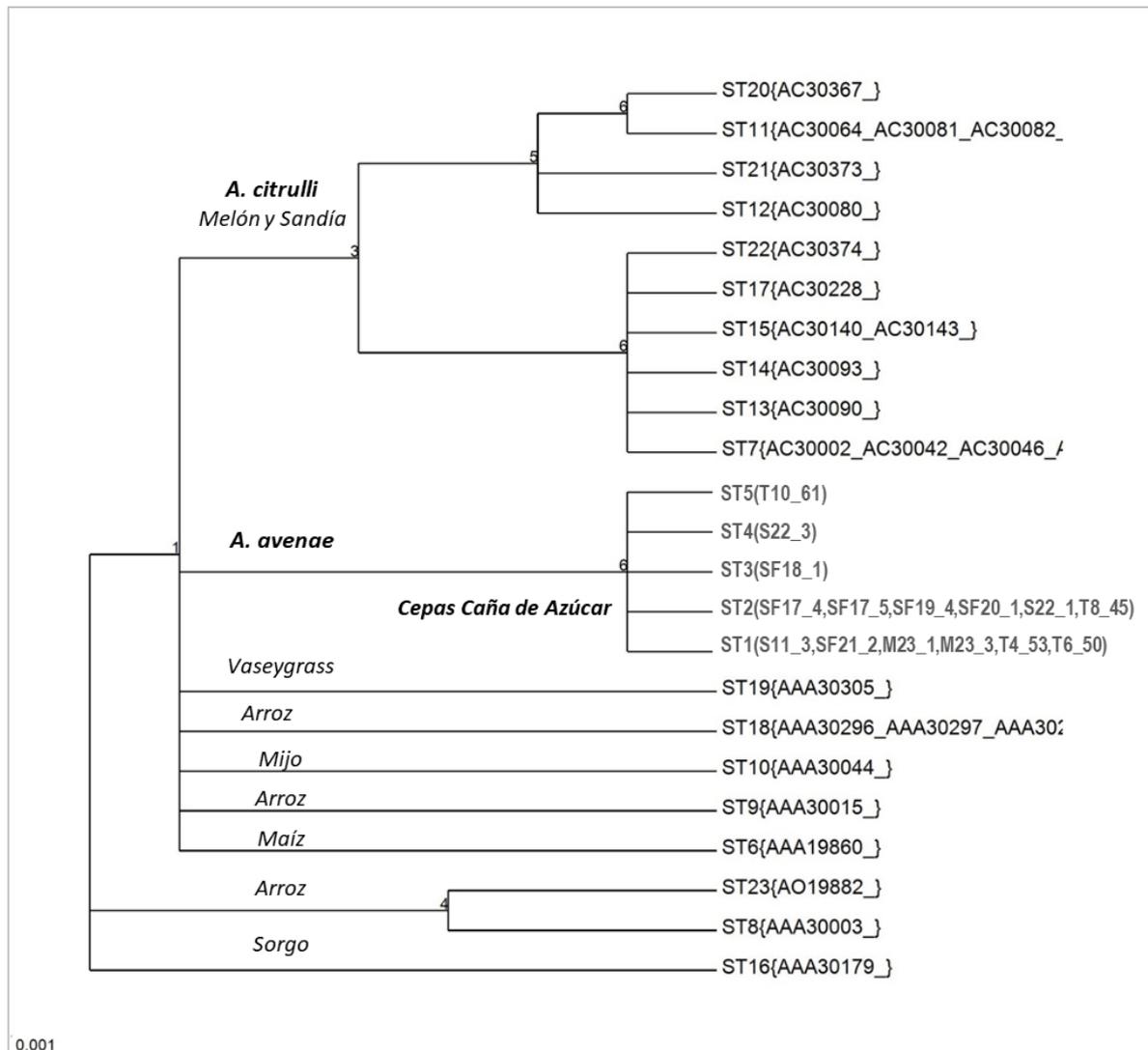
Se observaron dos complejos clonales para las cepas de *A. avenae* subsp. *citrulli* que también sugieren un patrón clonal. En la Fig. 3.6, se observan en gráficos de BURST los complejos clonales mencionados anteriormente, en los cuales el tamaño del círculo indica el número de cepas que contiene un ST, donde

el ST 7 y ST 11 se consideran como ST fundadores, es decir los genotipos de los cuales derivarían los otros dentro del complejo clonal.

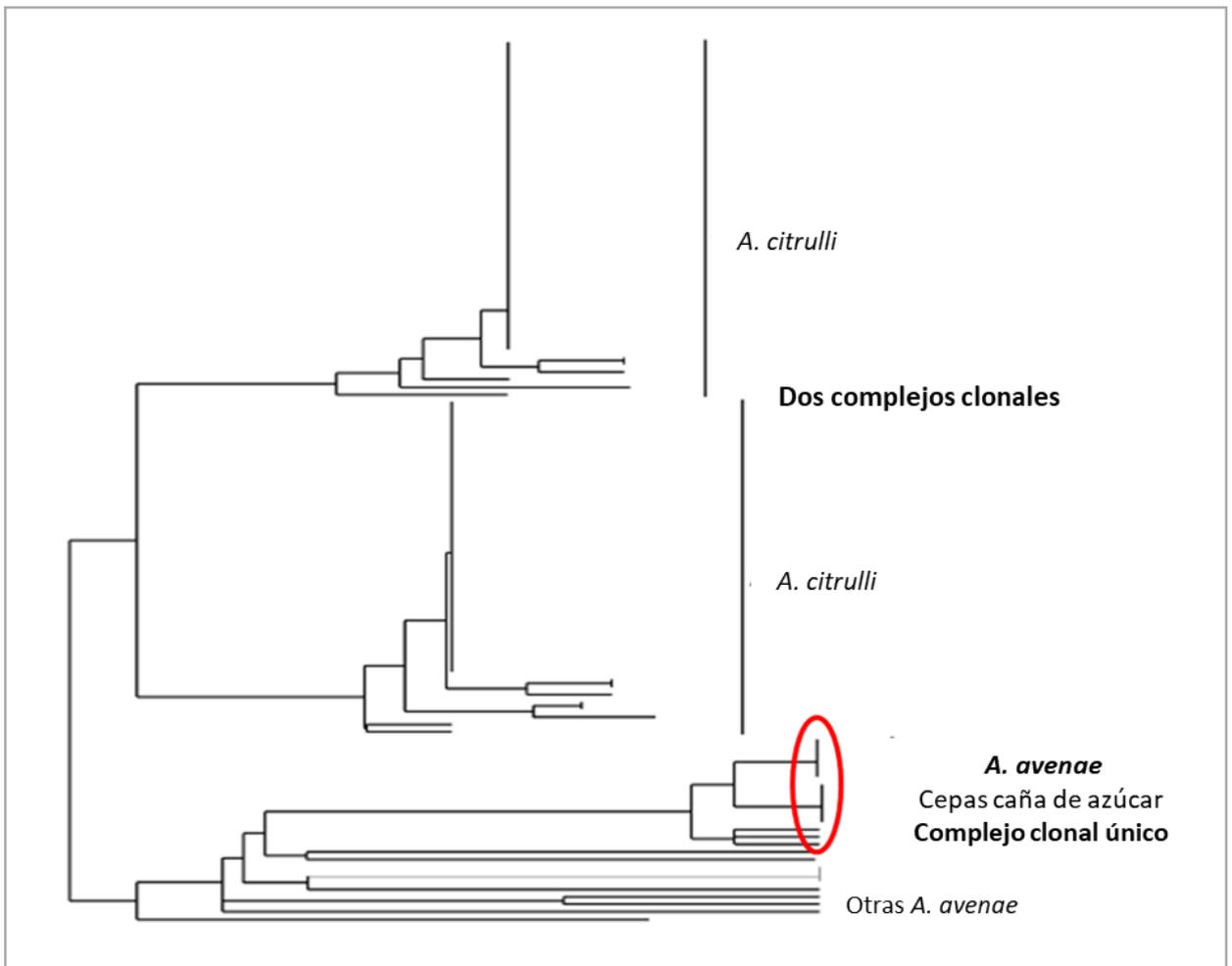
#### III.3.2.4. Recombinaciones genéticas en *Acidovorax* sp.

Las Fig. 3.7 a 3.13, muestran los árboles de Neighbor Joining (NJ) obtenidos para cada gen/locus, mientras que en la Fig. 3.14 se ve el mismo árbol construido con todas las secuencias concatenadas. Este último mostró la separación de *A. avenae* subsp. *citrulli* con una gran distancia filogenética de otras cepas de *A. avenae*, los valores sobre las ramas indican bootstrap (valor antes de la barra) y soporte consenso (número de genes cuyos árboles presentan en ese cluster). Se puede observar que la separación de *A. citrulli* del resto se logra con un alto valor de bootstrap (máximo=100) y al menos 5 genes mostrando el mismo cluster. Por otro lado, la separación de las cepas de *A. avenae* de caña también tiene buen soporte. Muchas de las ramas de *A. avenae* (subsp *avenae* de otros huéspedes) tiene bajo soporte ya sea de bootstrap (soporte consenso) sugiriendo la presencia de artefactos y elevada recombinación entre ellas. *A. oryzae* se agrupa junto a otras especies de *A. avenae*, pero no junto a las cepas provenientes de caña de azúcar. Las cepas aisladas de la caña de azúcar se agruparon entre ellas y se separaron de otras cepas con un alto valor de bootstrap y cuatro loci soportando la división, sugiriendo una posible especificidad del huésped (Fig. 3.14). No se detectó incongruencia topológica entre los árboles para cada locus en estas cepas, lo cual respalda el comportamiento clonal (Fig. 3.15). Por otro lado, los diagramas de escala multidimensionales creados a partir de matrices de distancia por pares, muestra que las cepas de *A. citrulli* se ubican muy separadas del resto. Nuevamente las cepas de *A. avenae* de caña se agrupan juntas mientras que las de *A. oryzae* se observan entremezclada entre el resto de las *A. avenae* subsp *avenae*. El gráfico (Fig. 3.16) representa muy bien la variabilidad de los datos (>90% en los dos ejes) (Fig.3.16). Sin embargo, hay que tener en cuenta que el análisis se basa en las secuencias concatenadas. Finalmente, con la red de consensos (consensus network) se muestra todas las ramas que aparecen en al menos dos árboles de genes individuales (es decir, si la rama que agrupa a las cepas aparece en al menos dos árboles de genes individuales, aparecerá en la

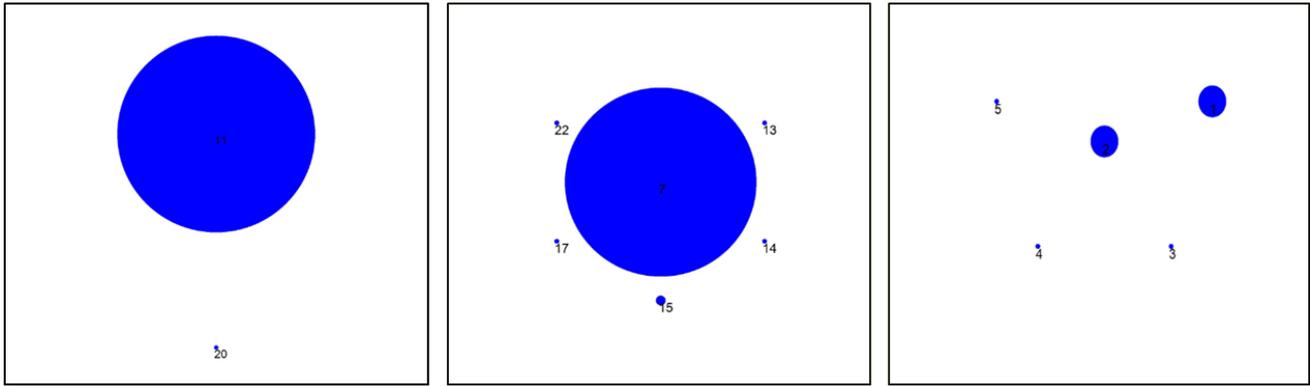
network) las regiones de la network con patrones de cuadrados o cubos indican recombinación. En concordancia con lo observado en los gráficos antes analizados, *A. citrulli* se presenta separado del resto y *A. avenae* con algunas estructuras que indican recombinación, pudiéndose inferir que la cepa de *A. oryzae* incluida en este análisis recibió genes de distintos orígenes (Fig. 3.17).



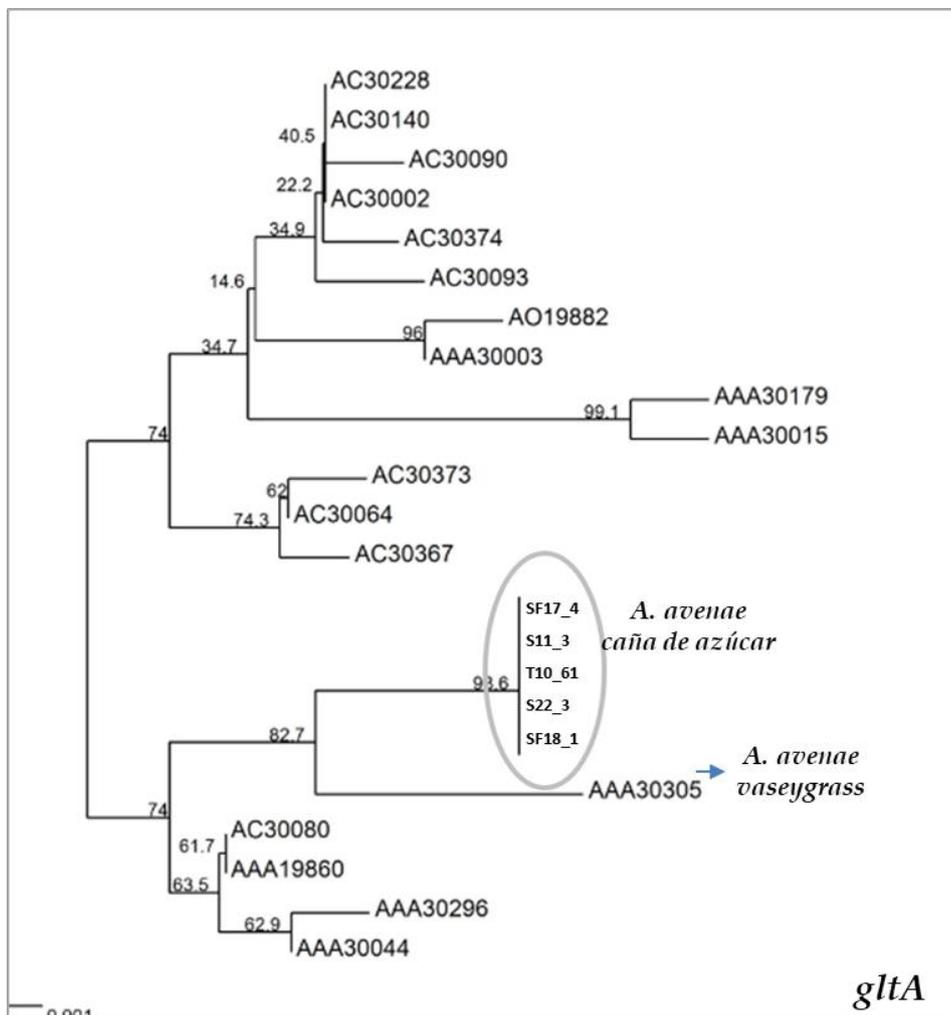
**Fig. 3.4.** Análisis BURST de cepas de *A. avenae* de caña de azúcar y otras *Acetivorus* mostrando los complejos clonales.



**Fig. 3.5.** Árbol de Neighbor Joining donde se grafican los perfiles alélicos, y los complejos clonales.



**Fig. 3.6.** Gráficos de BURST, complejos clonales: el tamaño del círculo indica el nº de cepas que contiene un ST.



**Fig. 3.7.** Árbol de Neighbor Joining para el gen *gltA*. Muestra cómo se agrupan las cepas de *A. avenae* de caña de azúcar (en el círculo), y las cepas de referencia de *A. citrulli*, *A. oryzae* y otras *A. avenae* subsp *avenae*.

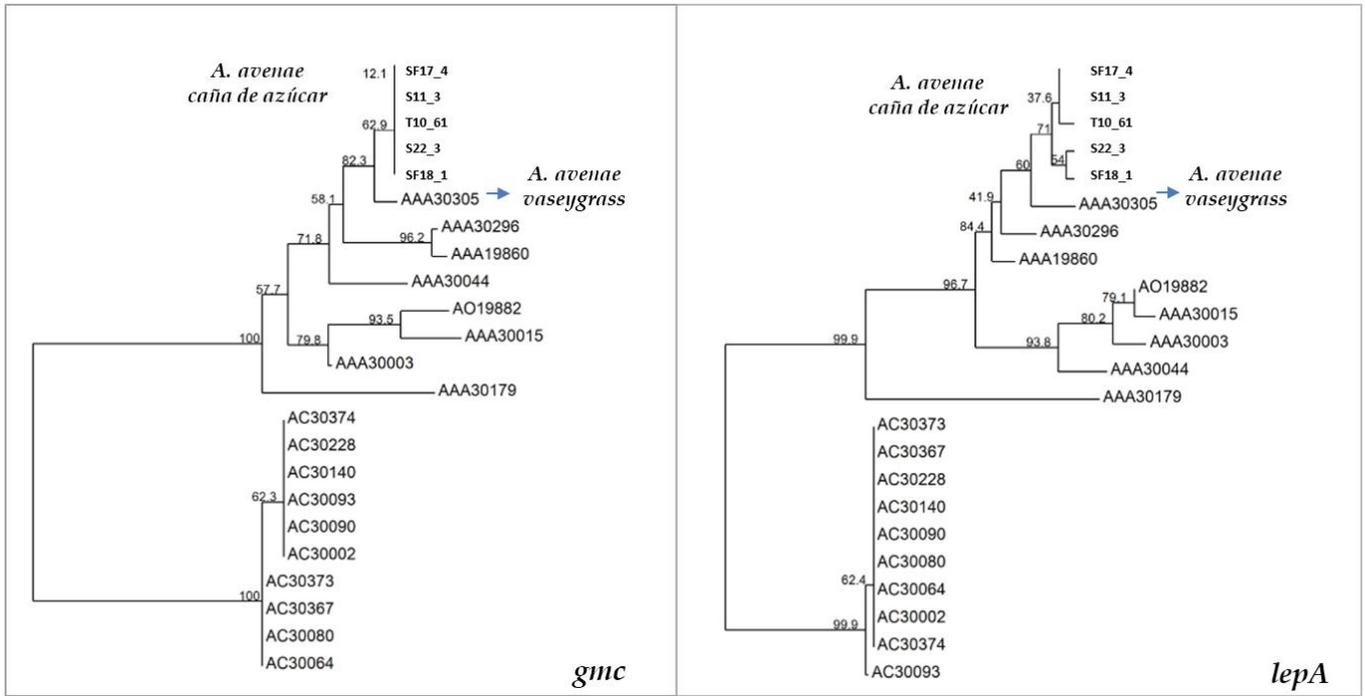


Fig. 3.8 y 3.9 Árbol de Neighbor Joining para el gen *gmc* y *lepA* respectivamente.



Fig. 3.10 y 3.11 Árbol de Neighbor Joining para el gen *phaC* y *pilT*, respectivamente.

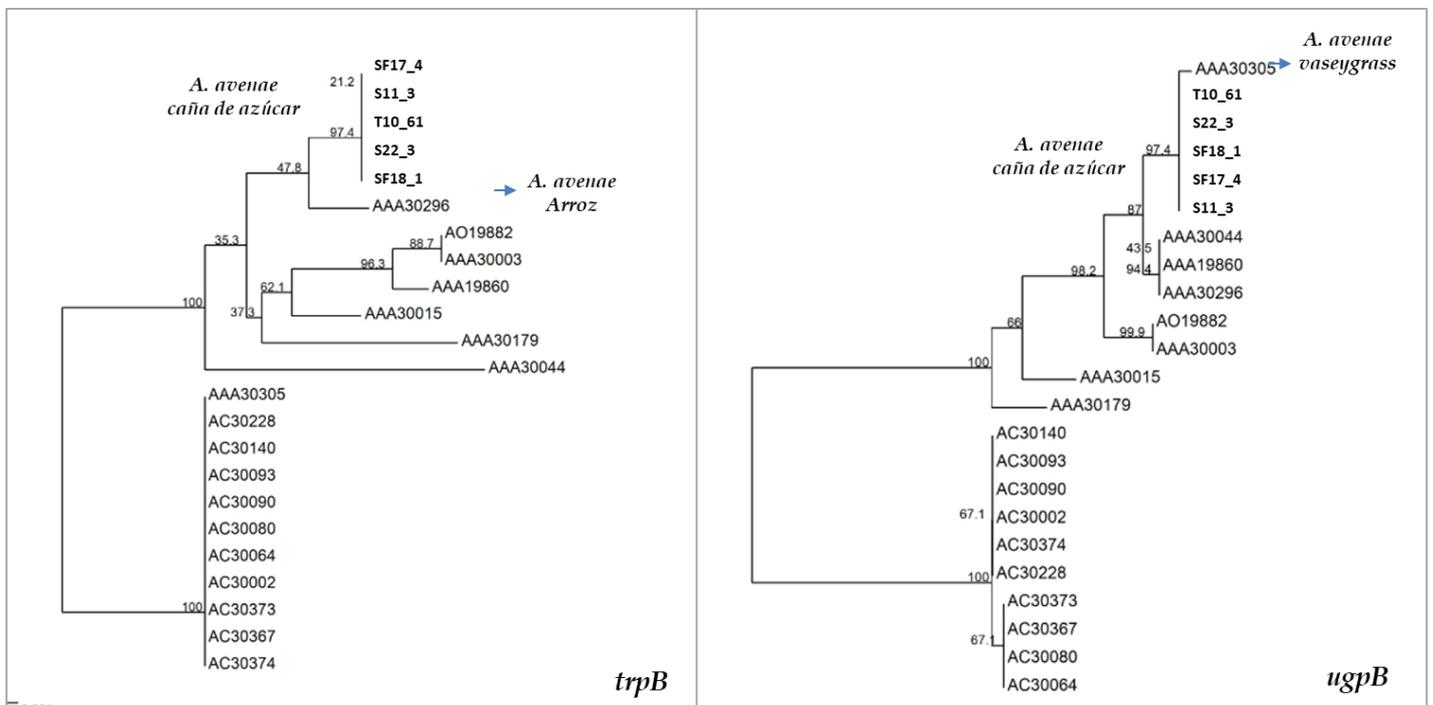


Fig. 3.12 y 3.13 Árbol de Neighbor Joining para el gen *trpB* y *ugpB*, respectivamente.

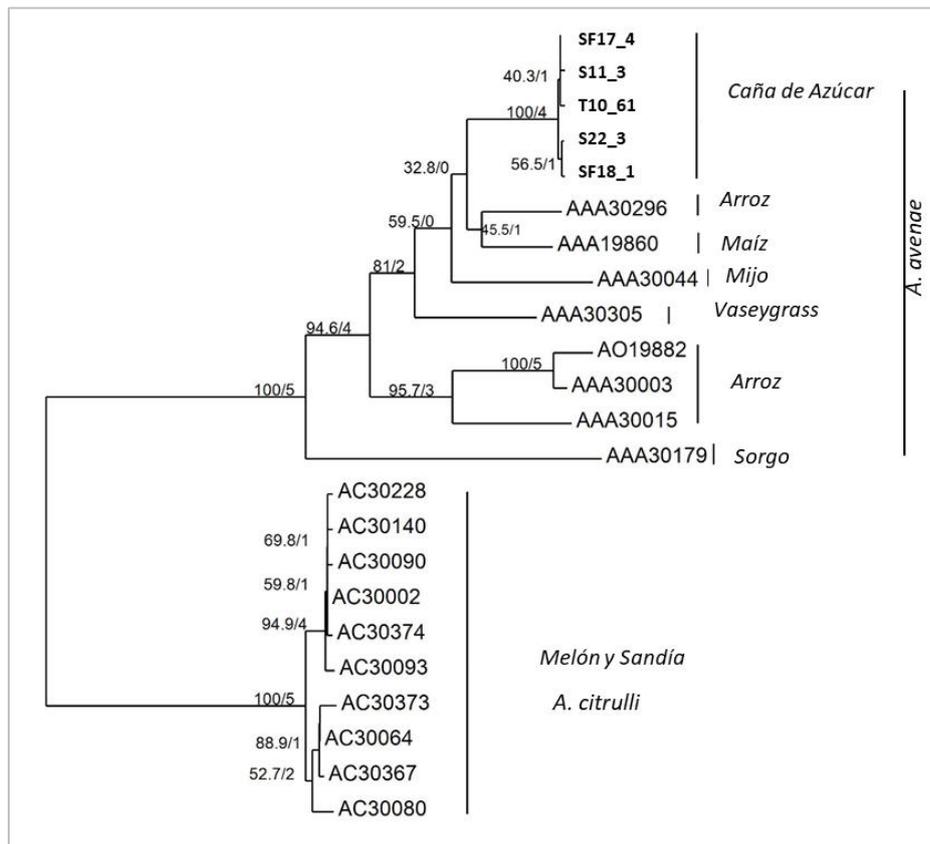
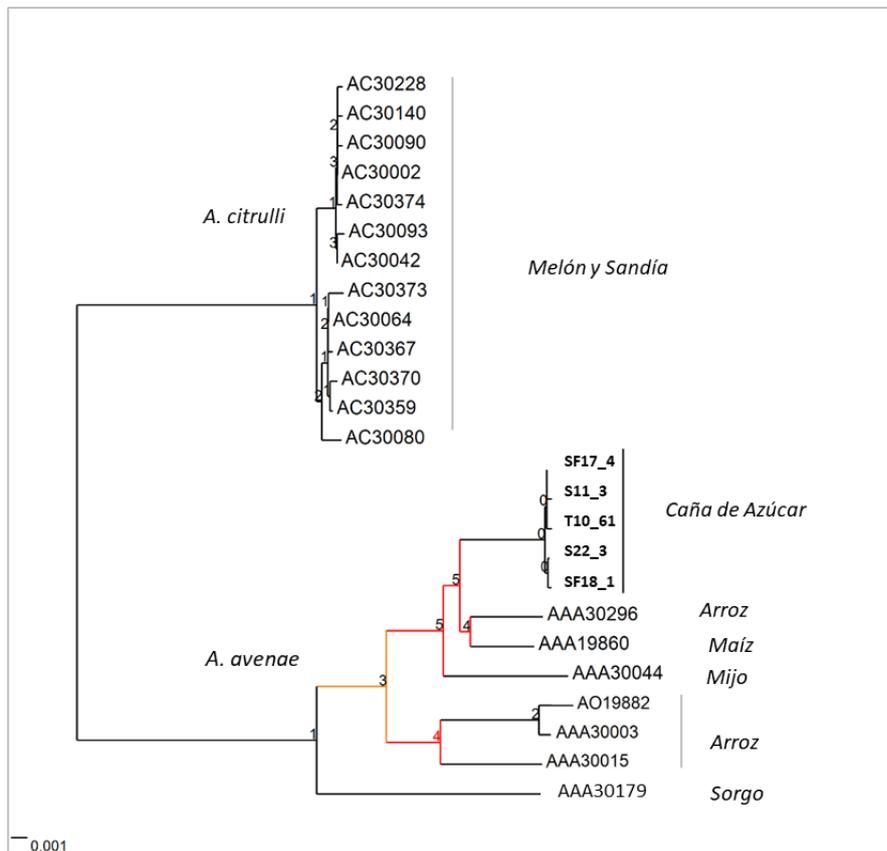
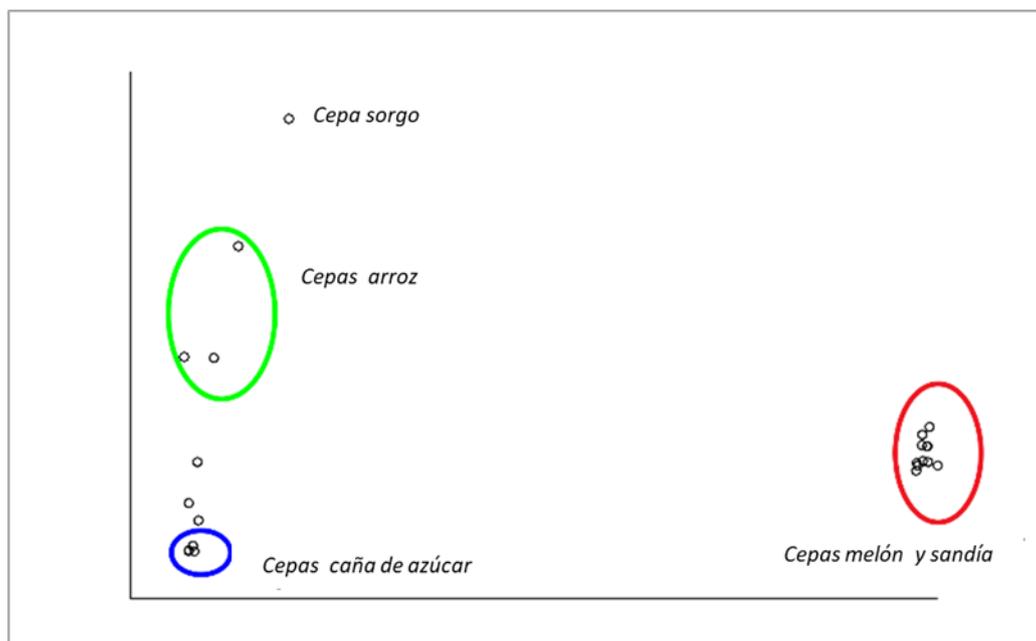


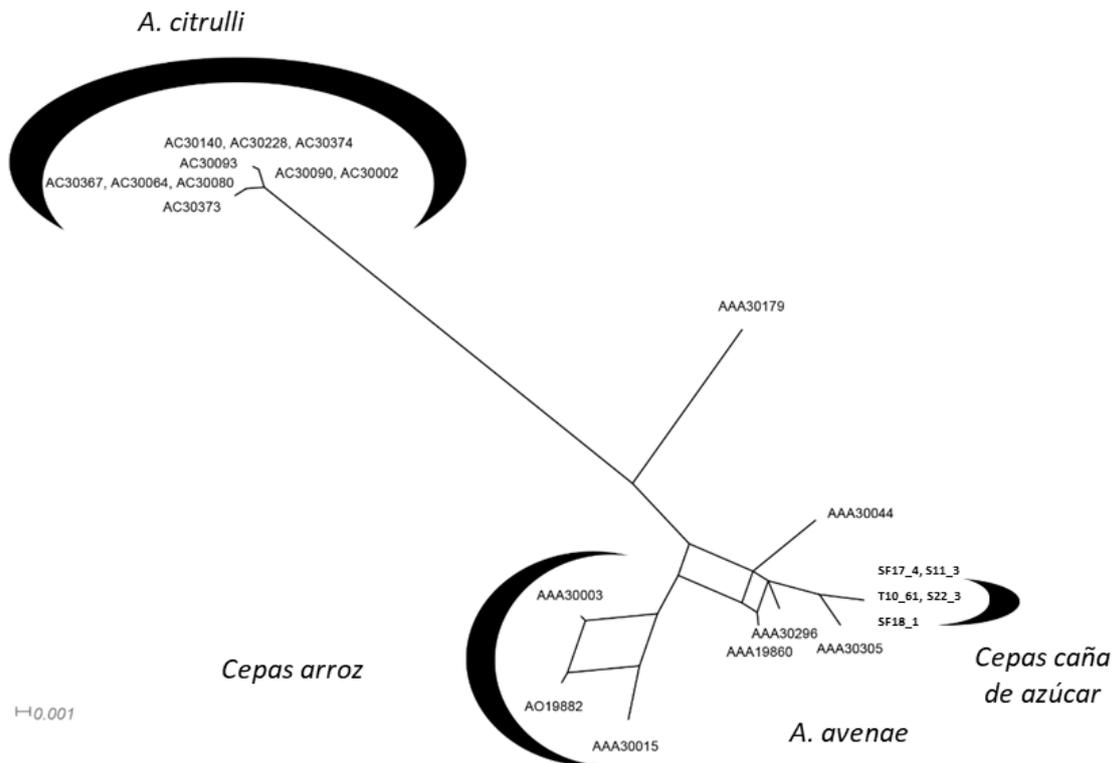
Fig. 3.14. Árbol de Neighbor-joining (N-J) del análisis de cepas de *Acidovorax* basado en la distancia p de las secuencias concatenadas de los siete loci. Valor Bootstrap (1000 replications) se muestran para cada rama.



**Fig. 3.15.** Incongruencia topológica basada en *loci* concatenados. Los números sobre las ramas indican el número de árboles de locus individuales que son incompatibles con dicha rama. Las ramas coloreadas indican que la incongruencia topológica es estadísticamente significativa con  $p < 0.01$  (naranja) y  $p < 0.001$  (rojo) según la prueba de Templeton.



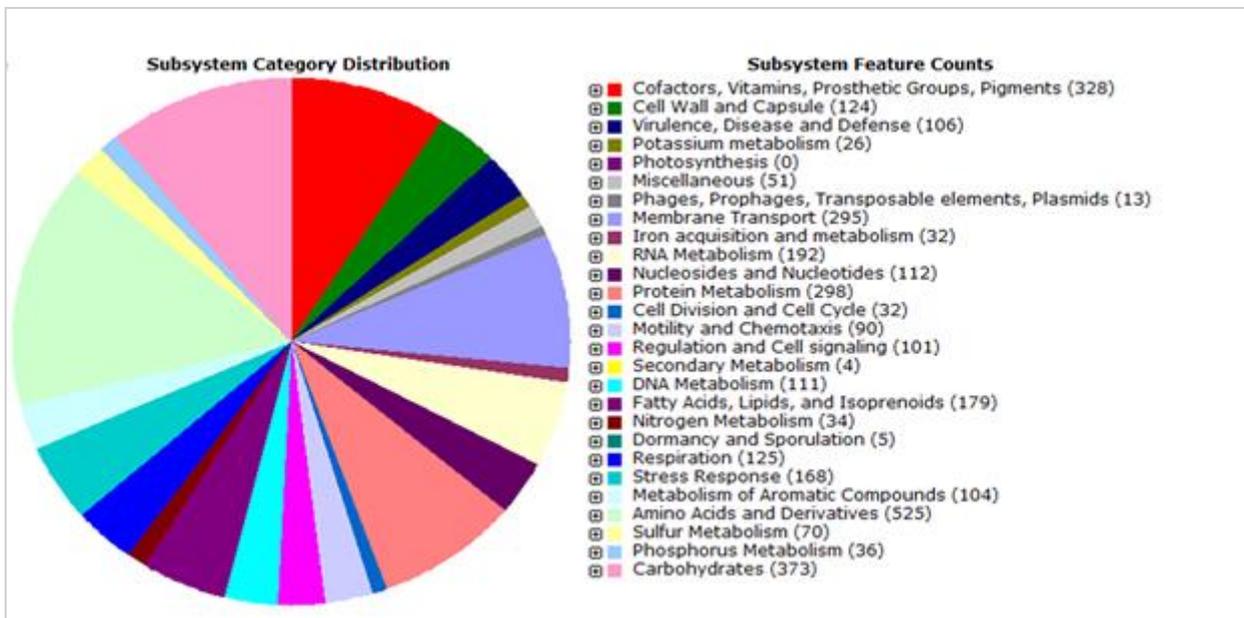
**Fig. 3.16.** Diagrama de escala multidimensional de las cepas de *Acidovorax* basado en las secuencias concatenadas. Los dos ejes explican una variabilidad  $>90\%$ .



**Fig. 3.17.** Red de consenso de los siete *loci* que muestra posible intercambio genético. Cada división en la red se muestra si al menos dos árboles tenían esa división. Las regiones de red con patrones cuadrados indican recombinación probable.

### III.4. El Genoma de *A. avenae* T10\_61

El genoma de *A. avenae* T10\_61 cepa aislada de caña de azúcar (variedad INTA NA 89-686 de Tucumán), tiene una dimensión de aproximadamente 5.646.552 pb, con 5096 genes (CDS), 58 ARNt distribuidos en 480 subsistemas. La anotación del genoma además informó que 525 genes se asocian al metabolismo de aminoácidos y derivados, 373 al metabolismo de carbohidratos, 107 relacionados al sistema de virulencia y defensa, entre otros (Fig. 3.18).

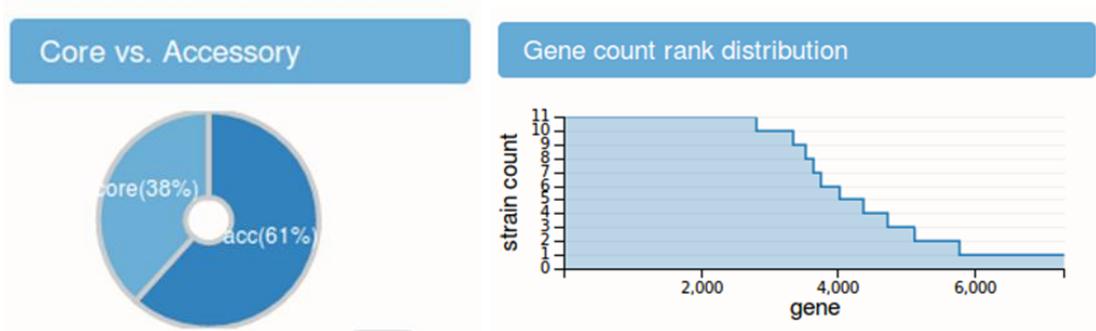


**Fig. 3.18.** Gráfico de distribución y número de genes en los diferentes subsistemas presentes en *A. avenae* T10\_61.

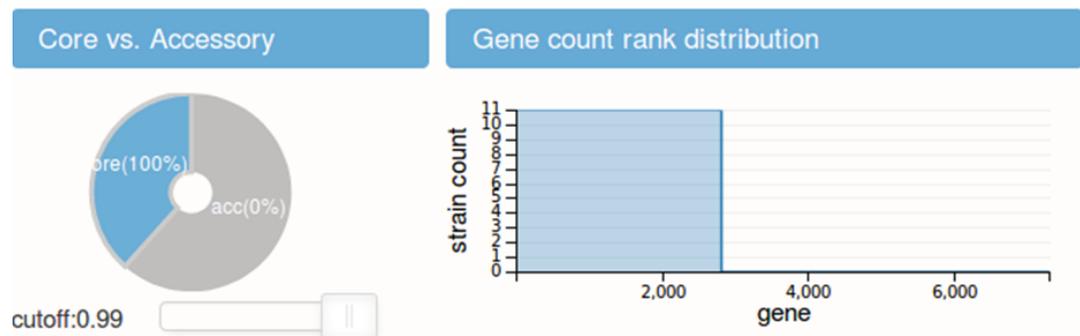
#### III.4.1. Análisis comparativo de genomas de *Acidovorax* sp.

La aplicación del software **panX**, permitió establecer relaciones filogenéticas a partir del análisis comparativo de 11 genomas de *Acidovorax* disponibles en la base de datos (Tabla 2.10 de Mat & Met).

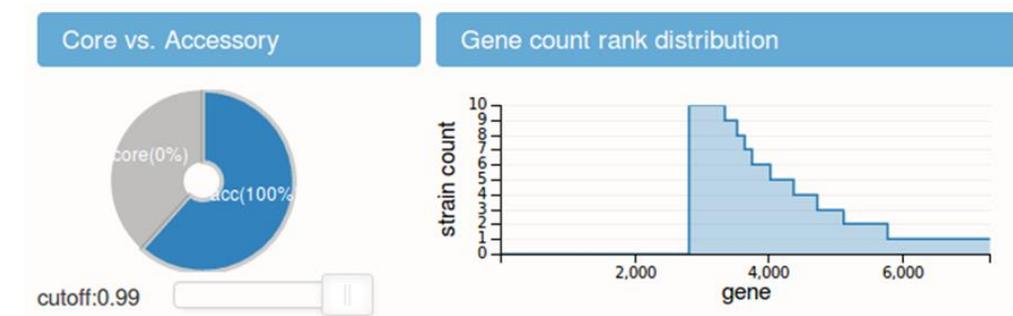
El análisis comparativo permitió determinar sobre un total de 7.301 genes la presencia de aproximadamente 2800 genes (38% del total de genes) en común para las 11 cepas que constituyen el “core” genoma, mientras que el resto 61% son los denominados genes “accessory” que son los que permiten la diferenciación entre las cepas comparadas (Fig. 3.19).



A



B



C

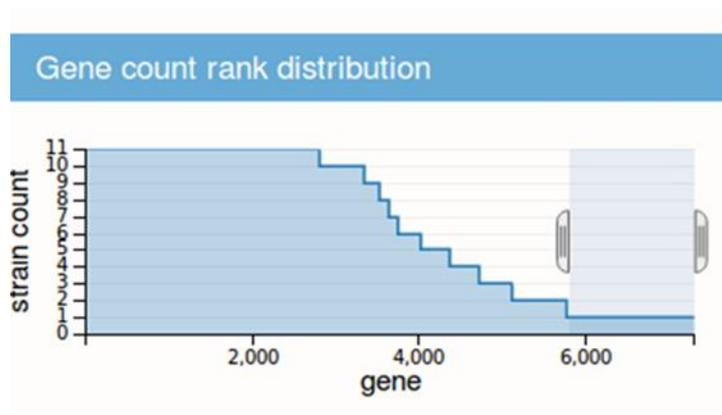
**Fig. 3.19.** Distribución de genes “Core vs Accessory” para las cepas analizadas (A). Selección solo de los genes que forman parte del “core genoma” (B) Visualización de los genes “Accessory” (C).

El programa de análisis permite la selección y visualización diferencial entre genes del “core” (Fig. 3.19 B) y los genes “Accessory” (Fig. 3.19 C).

A partir de la selección de los genes “Accessory” se identificó el grupo de genes únicos o diferencialmente expresados entre las especies (Fig. 3.20), y se obtuvo una descripción en una tabla, de las proteínas codificadas por los mismos.

En este sentido, debido a que los diferentes Sistemas de Secreción (SS) revisten una gran importancia en las interacciones moleculares planta-patógeno durante el proceso de infección, para transportar las proteínas a través de las membranas de las bacterias y, eventualmente del huésped, se consideró particularmente para explorar. Mediante la selección de proteínas pertenecientes a estos sistemas, se investigó con **panX**, la presencia de las mismas en los 11 genomas de *Acidovorax* sp. analizados (Anexo I).

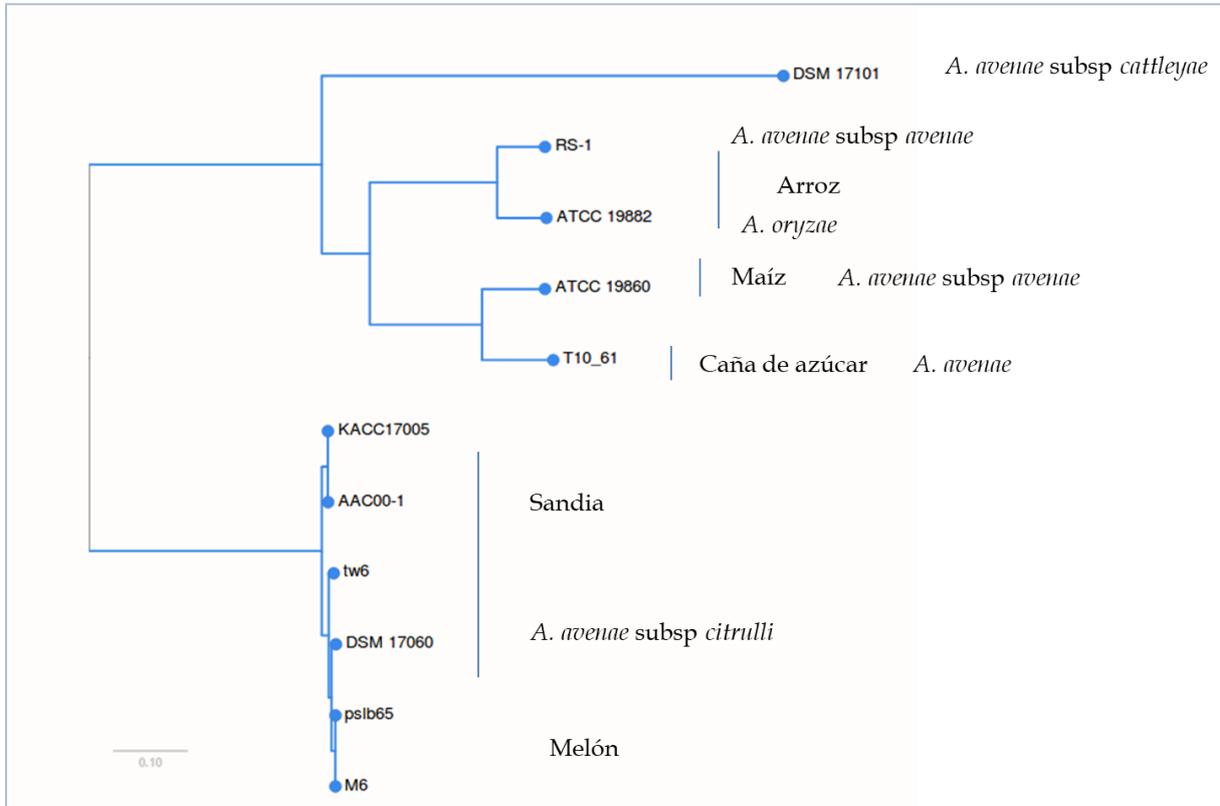
Tal como se ilustra en la Fig. 3.20, pudimos identificar genes presentes solo en una cepa (donde está posicionado el rectángulo) y aquellos compartidos por todas las cepas incluidas en el análisis.



**Fig. 3.20.** Ilustra la selección de genes únicos presentes en una de las cepas del grupo analizado.

El objetivo de este análisis, principalmente, fue obtener un agrupamiento basado en los SNP de los genes del “core” entre los genomas comparados. Este análisis confirma en parte los resultados obtenidos con el MLST, donde las cepas *A. citrulli* forman un *cluster* único y alejado de las demás (Fig. 3.21).

Por otra parte, del análisis de las secuencias genómicas se puede observar en la Fig. 3.21, que las cepas provenientes de arroz se agrupan juntas y muy cercanas entre sí.



**Fig. 3.21** Árbol filogenético obtenido del análisis de los SNPs de los genes del “core genome”. Se observan dos clusters principales, en la parte superior agrupadas las *A. avenae*, aunque bien separadas de acuerdo al huésped y fuera de ese grupo se ubica la cepa de *A. cattleyae*. En el cluster inferior todas las cepas de *A. citrulli* también se distinguen las cepas según el huésped. Los nombres de las cepas se tomaron tal cual como se encuentran en la base de datos de GenBank.

### III.5. Niveles de virulencia de las cepas de *Acidovorax avenae* evaluadas

Las cepas de *A. avenae* T10\_61, S11\_3, S22\_3, SF17\_4 y SF18\_1 reprodujeron los síntomas de estría roja en las hojas de caña de azúcar, variedad TucCP 77-42. Se observaron diferencias significativas ( $F = 520,82$ ;  $P < 0,0001$ ) en la severidad de los síntomas entre las cepas que representan diferentes ST.

Como se muestra en la Tabla 3.3, las cepas S22\_3 y S11\_3 fueron más virulentas (con una severidad promedio de 3,65 y 3,11, respectivamente) que las cepas SF17\_4 y SF18\_1 (severidad promedio de 2,20 y 2,30, respectivamente). Las cepas S22\_3 y S11\_3 desarrollaron lesiones consideradas como estrías severas y generalizadas, afectando el brote apical en algunos casos. Las cepas SF17\_4 y SF18\_1 exhibieron una virulencia intermedia desarrollando lesiones típicas de estrías rojas en las hojas. *A. avenae* T10\_61, que se usó además como control positivo, mostró un nivel de severidad menor de los síntomas en comparación con el resto de las cepas (severidad media de 1,60). En la Fig. 3.22, se observan los síntomas calificados de acuerdo a la escala de valor de 0 a 4.

En todos los casos, se observaron los primeros síntomas después de 48 horas de la inoculación, pero la virulencia/agresividad fue más evidente para las cepas de *A. avenae* S22\_3 y S11\_3 que presentaron síntomas más severos desde la aparición de los síntomas generalizados. No se observó muerte de plántulas debido a la pudrición del brote apical (o brote guía) hasta los 10 días post inoculación. *A. avenae* se re aisló con éxito de hojas de caña de azúcar inoculadas.

**Tabla 3.3.** Valores de severidad promedio obtenidos para cada tratamiento en los ensayos de virulencia.

Cepas	Severidad promedio $\pm$ EE
Control	0,00 $\pm$ 0,05a
T10_61	1,61 $\pm$ 0,05b
SF17_4	2,20 $\pm$ 0,05c
SF18_1	2,30 $\pm$ 0,05c
S11_3	3,11 $\pm$ 0,05d
S22_3	3,56 $\pm$ 0,05e

**Nota:** Las letras al lado de cada valor indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD Fisher ( $P < 0,05$ ).



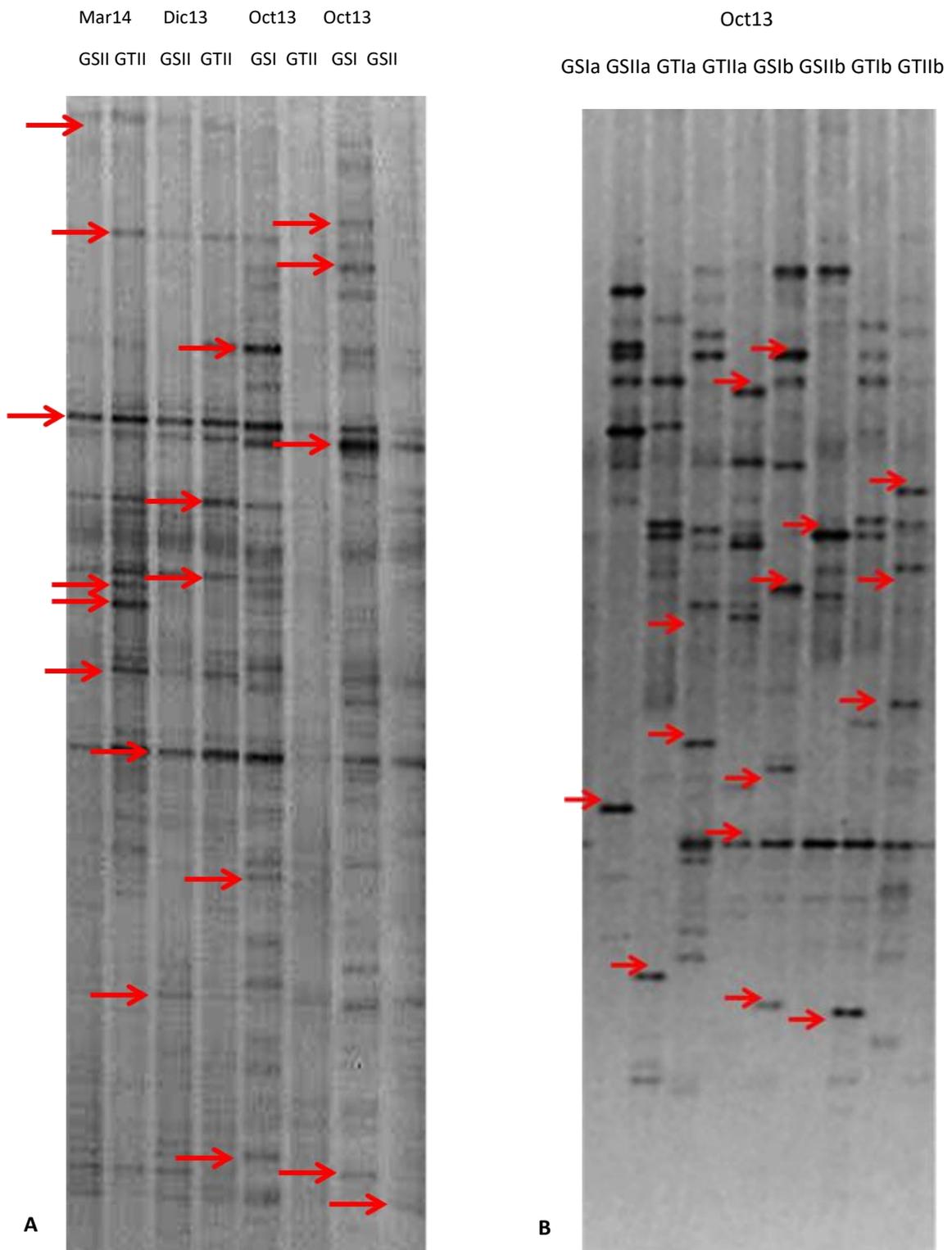
**Fig. 3.22:** Síntomas de estría roja desarrollados en plantines de caña de azúcar a partir de inoculaciones artificiales. De acuerdo con la escala de calificación 0 a 4: a) 0 = sin síntomas, b) 1 = infección localizada y menos de tres estrías rojas por hojas; c) 2 = infección avanzada y más de tres estrías por hojas; d) 3 = infección severa con estrías que alcanzan el brote apical; e) 4 = podredumbre apical y/o muerte del brote guía.

## III.6. Estudio de comunidades microbianas y su interacción con el patosistema *Acidovorax*- caña de azúcar

### III.6.1. Análisis mediante DGGE

La técnica de DGGE proporcionó diferentes perfiles de comunidades microbianas presentes en muestras de suelo y hojas de caña de azúcar. De las diferentes combinaciones de cebadores ensayados, el par V3-Uni, fue el que mostró perfiles con bandas de mejor y mayor intensidad y polimorfismos más claros entre las muestras. Los perfiles que se muestran la Fig. 3.23 corresponden a ocho muestras de suelo (A) y hojas (B) analizadas mediante DGGE y a partir de los cuales se seleccionaron y cortaron las bandas más intensas para su análisis mediante secuenciación. Los resultados de la secuenciación para todos los fragmentos seleccionados se muestran en la Tabla 3.4. En ambos casos se observa un alto porcentaje de *Bacillus*, endófitos, rizoféricos y algunos asociados a promotores del crecimiento vegetal, aunque ninguno de ellos estudiados ni descritos en profundidad para el sistema de cultivo de caña de azúcar. En general, cuando se realizaron las electroforesis de ADN total de suelo, la intensidad de bandas fue siempre inferior respecto de la obtenida para las muestras de hoja, y los perfiles muy similares entre sí, es decir que evidenciaron un bajo nivel de polimorfismo para las condiciones y muestras analizadas.

La Fig. 3.24 muestra los perfiles DGGE de hojas, donde además se incorporó al análisis ADN de *Acidovorax avenae* de un cultivo de células puro, con el fin de contar con una herramienta de detección de la bacteria en muestras asintomáticas, ya que, si bien el lote del ensayo presenta antecedentes de elevada presión de inóculo, al momento del muestro las hojas presentaban muy poco síntoma o incluso ninguno. Como indica la flecha en la figura sólo una muestra a partir de hojas de genotipo susceptible (GS), mostró una banda con migración similar al ADN de *Acidovorax*.

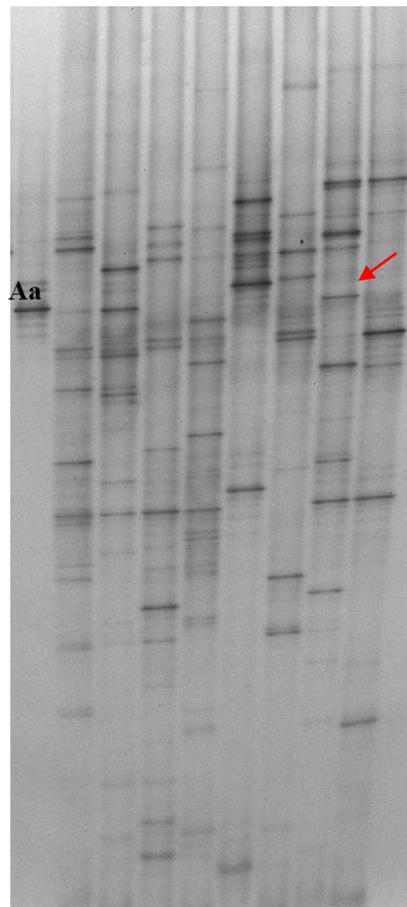


**Fig. 3.23.** Fragmento del gel de una electroforesis de DGGE de muestras de suelo (A) y de hojas (B) donde se observan algunas de las bandas más intensas, indicadas con flechas, seleccionadas para secuenciar.

Con las DGGE de muestras de suelo, también se realizaron pruebas de este tipo para explorar la presencia de *Acidovorax avenae* (Aa), pero en este caso no se detectó la presencia de ninguna banda de migración similar.

Oct 13

Aa GTIa GTIIa GTIb GTIIb GSIa GSIIa GSIIb



**Fig.3.24.** DGGE de ADN total de hojas con un ADN de cultivo puro de *A. avenae*. Sólo en la línea GSIIb indicada con la flecha roja, se observa una banda con migración similar a la banda de *Acidovorax* (Aa).

**Tabla 3.4.** Bandas analizadas a partir de los geles DGGE.

Muestra	Fecha	Banda	Similitud	%	
GS IIS	Mar2014	17_1	<i>Arthrobacter sp.</i>	89	actinobacteria
GS IIS	Mar2014	17_2	<i>Bacillus nealsonii</i>	99	endófito de maíz
GT IIS	Mar2014	18_1	<i>Bacillus nealsonii/niabensis</i>	99	endófito de maíz/tabaco
GT IIS	Mar2014	18_2	<i>Bacillus niacini</i>	97	PGPR-FBN
GT IIS	Mar2014	18_3	<i>Bacillus niacini</i>	90	PGPR-FBN
GT IIS	Mar2014	18_4	<i>Bacillus niacini/(uncultured bacterium</i>	99	PGPR-FBN
GS IIS	Dic2013	19_1	<i>Bacillus niacini/fumarioli</i>	96	PGPR-FBN
GS IIS	Dic2013	19_2	<i>Arthrobacter sp.</i>	96	actinobacteria
GT IIS	Dic2013	20_1	<i>Bacillus azotoformans</i>	97	bacteria marina
GT IIS	Dic2013	20_2	<i>Bacillus mycoides</i>	97	bacteria rizosférica
GS IAP	Oct2013	25_1	<i>Bacillus megaterium</i>	98	bacteria rizosférica
GS IAP	Oct2013	25_2	<i>Rhodococcus qingshengii</i>	98	actinobacteria
GS IAP	Oct2013	25_3	<i>Kutzneria sp.</i>	100	actinobacteria
GS IBS	Oct2013	27_1	<i>Promicromonospora sukumoe</i>	90	actinobacteria
GS IBS	Oct2013	27_2	<i>Thermoactinomycetaceae</i>	87	Bacillales; Thermoactinomycetaceae
GS IBS	Oct2013	27_3	<i>Sugarcane phytoplasma (uncultured)</i>	98	
GS IBS	Oct2013	27_5	<i>Streptomyces sp.</i>	99	actinobacteria
GS IIAS	Oct2013	28_1	<i>Bacillus nealsonii</i>	96	endófito de maíz
GS IAP	Oct2013	PTA19	<i>Bacillus djibelorensis/Sphingomonas sp</i>	95	Sphingomonas sp bacteria rizoferica
GT IIBP	Oct2013	PTA24	<i>Clostridium sp</i>	89	
GS IIBP	Oct2013	PTA21	<i>Uncultured Clostridiales bacterium</i>	95	
GS IBP	Oct2013	PTA22	<i>Tenuibacillus sp./Bacillus bacterium</i>	90	
GS IBP	Oct2013	PTA28	<i>Bacillus aestuarii/Brevibacillus sp</i>	90	Firmicutes
GS IIBP	Oct2013	PTA26	<i>uncultured Acidobacteria bacterium</i>	98	
GS IIBP	Oct2013	PTA21x	<i>Bacillus benzoevorans/B. nealsoni</i>	96	
GT IBP	Oct2013	PTA23	<i>Bacillus persicus/Bacillus foraminis</i>	96	
GT IIAP	Oct2013	PTA17	<i>uncultured actinobacterium</i>	98	
GT IIBP	Oct2013	PTA24x	<i>Uncultured bacteria</i>	98	
GT IBP	Oct2013	PTA23x	<i>Bacillus rubiinfantis</i>	96	
GS IAP	Oct2013	PTA10	<i>Bacillus circulans/B.firmus</i>	94	
GS IIAP	Oct2013	PTA12	<i>Bacillus megaterium</i>	93	
GT IIAP	Oct2013	PTA15	<i>Bacillus niacini</i>	94	
GS IBP	Oct2013	PTA20	<i>uncultured bacterium</i>	93	

Nota: GT genotipo tolerante; GS genotipo susceptible, I muestra 1; II muestra 2, A-B, repeticiones, S suelo, P Planta

### **III.6.2. Estructura y composición de la microbiota del suelo en el patosistema “caña azúcar-*Acidovorax*”**

A partir de la gran cantidad de información generada a través de la tecnología de secuenciación de alto rendimiento, también conocida como NGS del inglés “Next Generation Sequencing” se procedió a la identificación de OTUs (Unidad taxonómica operativa) y el análisis de los parámetros de diversidad “Alpha” (riqueza y homogeneidad de la comunidad microbiana analizada individualmente) y diversidad “Beta” (comparación entre diferentes comunidades tomando en cuenta distribución de especies). Estos son los conceptos más importantes a tener en cuenta durante el análisis para la comprensión de la estructura y composición de la comunidad microbiana estudiada. En una primera etapa de análisis se tomaron todas las secuencias de todas las muestras (30 en total) para tener la mayor información en cuanto a abundancia y composición. Luego para realizar análisis comparativos y de clusters fue necesario “normalizar” los datos para tener un número uniforme de secuencias, reduciéndose de esta manera a 20 (veinte) muestras finales.

#### **III.6.2.1. Análisis de diversidad “Alpha”**

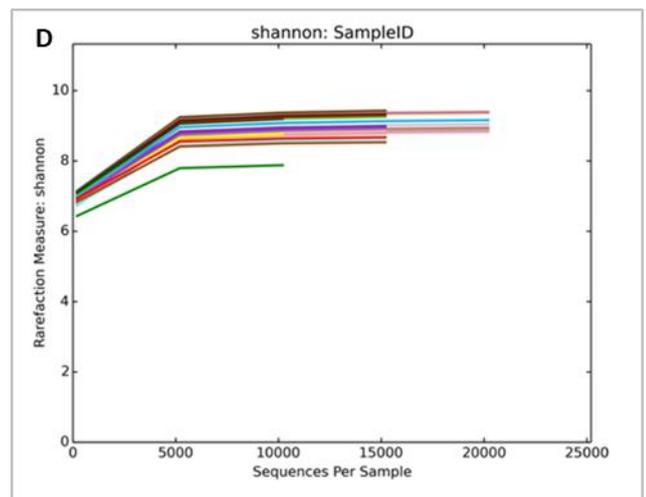
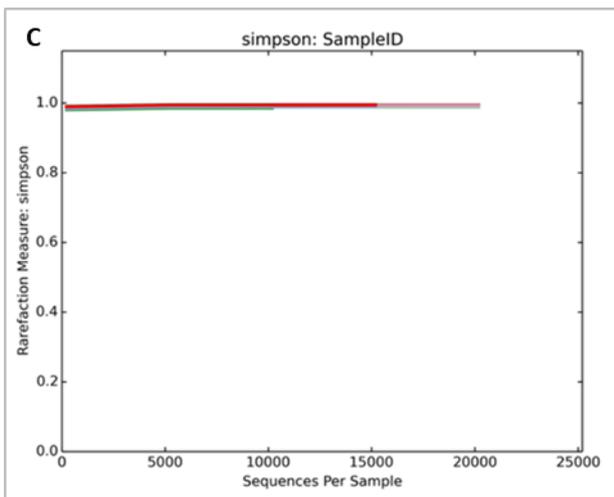
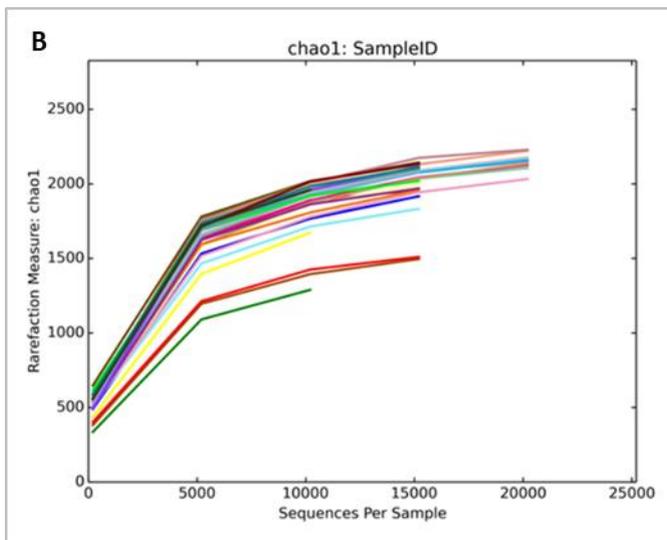
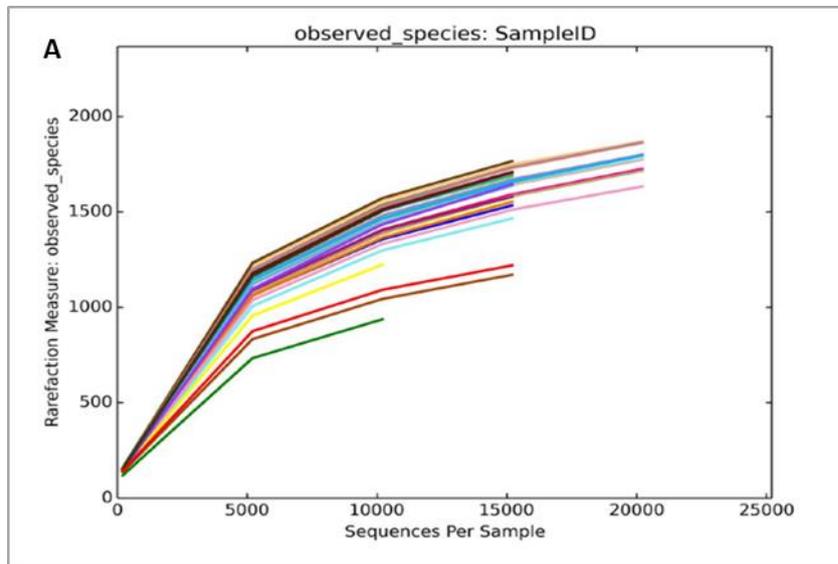
La asignación taxonómica mostró que el 99,4% de las secuencias se clasificaron correctamente a nivel de género y 94,4% a nivel de especie. La Fig. 3.25(A) muestra las curvas de rarefacción para cada muestra de suelo analizada donde se observa el número de secuencias y la medida de rarefacción para cada una de ellas. Las curvas de rarefacción generalmente crecen rápidamente al principio, ya que se encuentran las especies más comunes, pero alcanzan una meseta cuando las especies más raras permanecen para ser muestreadas. Se graficaron además las métricas 'chao1', 'Simpson', 'Shannon' (Fig. 3.25 B, C y D respectivamente), que representa la diversidad, o riqueza de especies que están presentes en cada muestra y los valores en índice para cada uno de estos parámetros se presentan en la Tabla 3.5. El índice de Simpson indica la dominancia de las especies y refleja la probabilidad de que dos individuos pertenecientes a la misma especie sean elegidos al azar. Varía de 0 a 1 (1 máxima diversidad). El índice de Shannon mide el grado medio de incertidumbre. El

valor aumenta a medida que aumenta el número de especies y cuando la distribución de los individuos entre las especies se hace pareja.

**Tabla 3.5.** Número de secuencias analizadas, cobertura de muestra estimada para el amplicón de ARNr 16S, riqueza Chao 1 e índices de diversidad Shannon y Simpson.

ID Muestras	N°Sec*	Chao1	Cobertura	Ind. Shannon	Ind. Simpson
S56	15200.0	1958.071	0,97	9.015	0,995
S57	15200.0	1917.639	0,97	9.011	0,994
S58	15200.0	1958.860	0,97	8.788	0,991
S59	>15200.0	1289.702	0,96	7.881	0,985
S60	15200.0	1970.404	0,97	8.992	0,993
S61	>15200.0	1673.130	0,96	8.764	0,995
S62	15200.0	1833.648	0,97	8.618	0,991
S63	15200.0	1944.338	0,97	8.802	0,992
S64	15200.0	2098.484	0,97	9.341	0,996
S65	15200.0	2131.877	0,97	9.434	0,996
S66	15200.0	2108.026	0,97	9.409	0,996
S67	15200.0	2020.255	0,97	9.288	0,995
S68	15200.0	2132.416	0,97	9.340	0,996
S69	15200.0	2076.096	0,97	8.809	0,988
S70	15200.0	2087.973	0,97	9.361	0,996
S71	15200.0	2036.545	0,97	8.835	0,988
S72	15200.0	2081.178	0,97	9.136	0,995
S73	15200.0	1997.214	0,97	8.828	0,993
S74	15200.0	2090.406	0,97	9.018	0,994
S75	15200.0	2043.774	0,97	8.913	0,993
S76	15200.0	2076.187	0,97	9.130	0,994
S77	15200.0	2039.550	0,97	8.892	0,994
S78	15200.0	2144.885	0,97	9.284	0,995
S79	15200.0	2117.779	0,97	8.934	0,994
S80	15200.0	2174.959	0,97	9.372	0,996
S81	15200.0	2111.116	0,97	9.333	0,996
S82	15200.0	2140.422	0,97	9.327	0,996
S83	>15200.0	1960.937	0,95	9.195	0,996
S84	15200.0	1496.702	0,97	8.532	0,993
S85	15200.0	1510.961	0,97	8.678	0,995

\*se tomaron 15mil secuencias como número de referencia para el análisis de los índices salvo las muestras S59, S61 y S83 con menor número (12500).



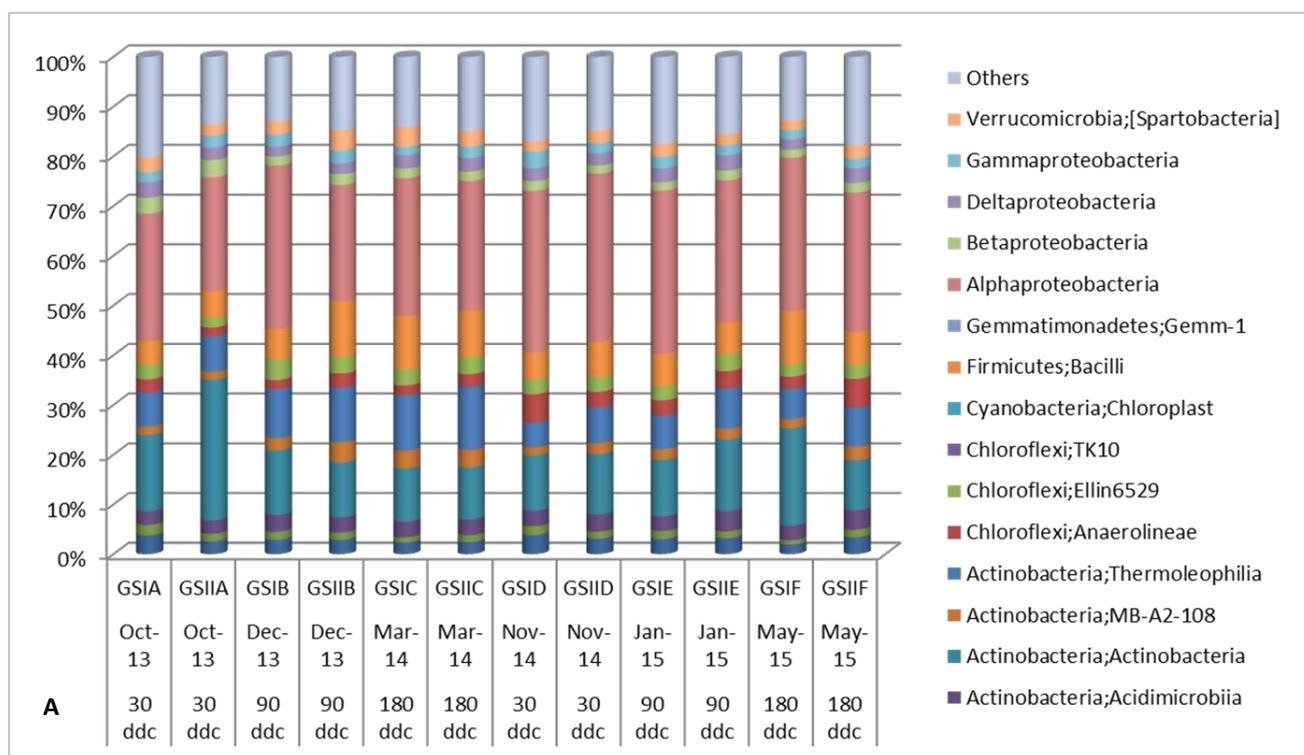
**Fig. 3.25.** A. Curvas de rarefacción donde se muestran secuencias totales por muestra; B. Índice de Chao1; C. Simpson; D. Shannon.

### III. 6.2.2. Análisis de OTUs

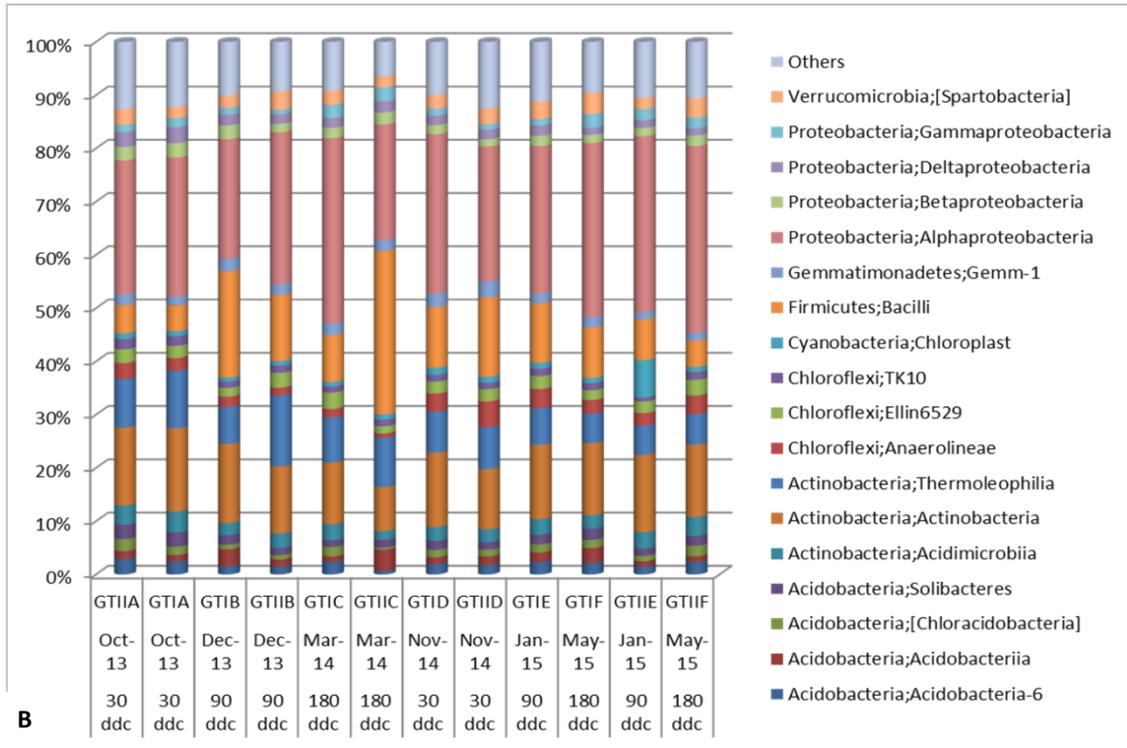
Los siguientes gráficos corresponden a histogramas donde se pueden visualizar, a diferentes niveles taxonómicos, la composición microbiana principal.

En la Fig. 3.26 A y B se grafican las clases más abundantes para el genotipo susceptible (TucCP 77-42) en todos los muestreos (días desde cosecha “ddc”) y para el genotipo tolerante (LCP 85-384) respectivamente.

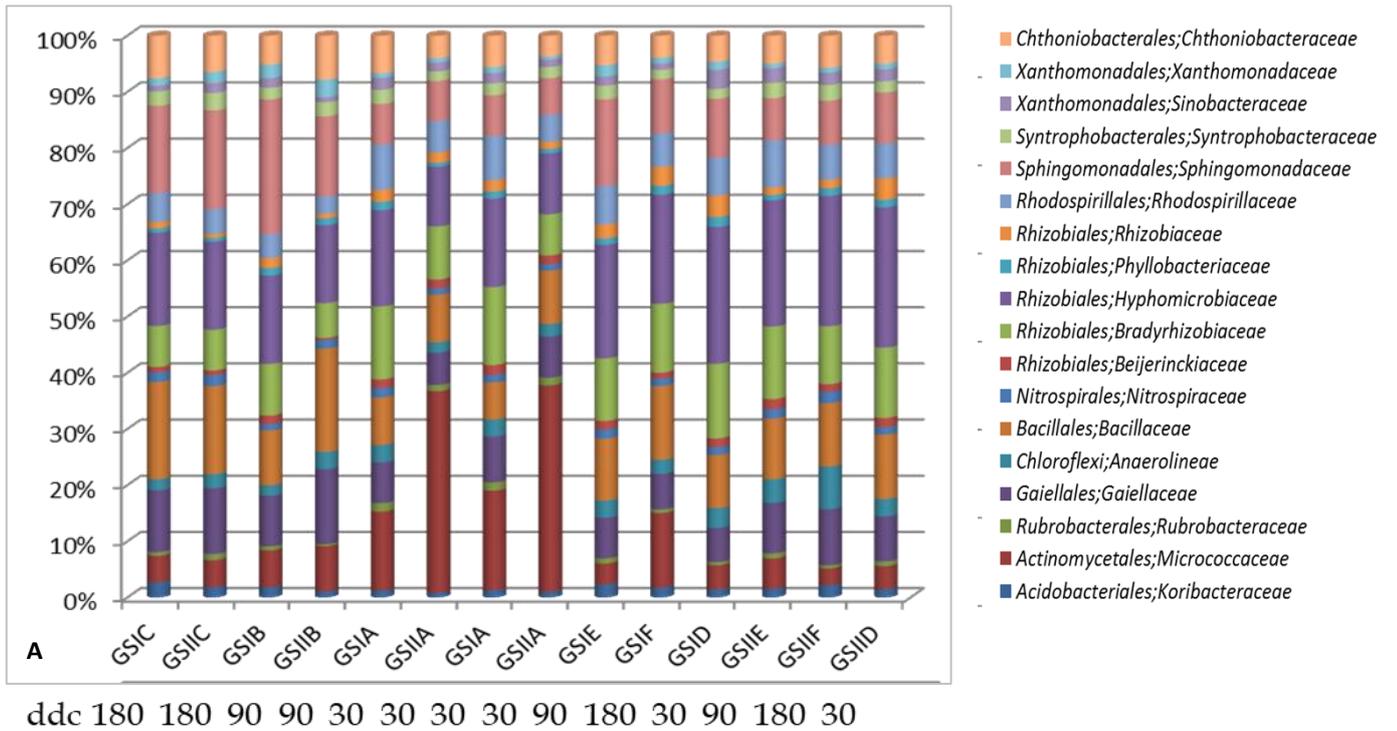
En ambos casos, se observa entre las clases más abundantes, *Alfaproteobacterias*, *Fimicutes*, *Actinobacterias* y *Acidobacterias*.

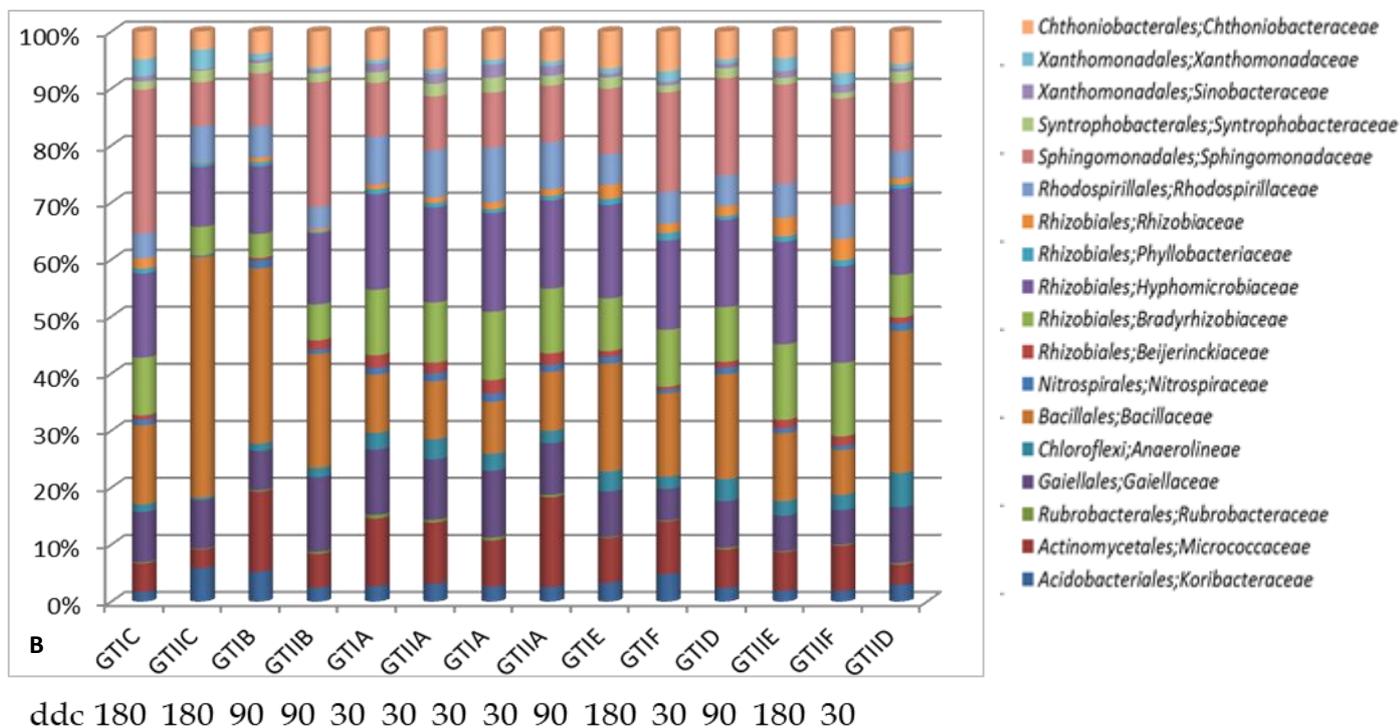


**Fig. 3.26.** Clases más abundantes observadas en el GS (A) y en el GT (B).



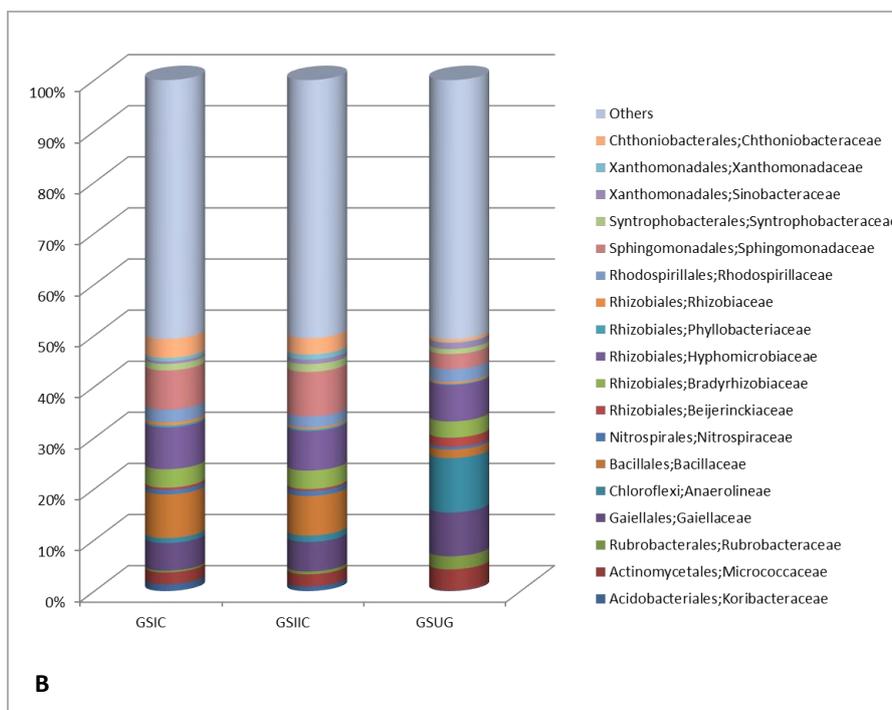
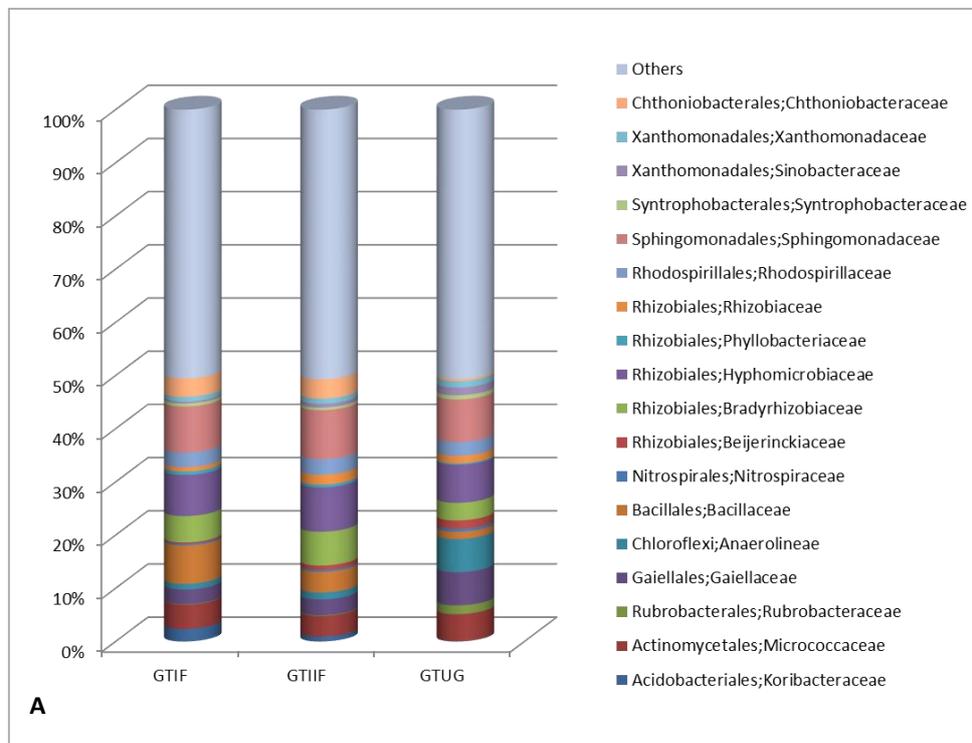
En la Fig. 3.27 se muestran la abundancia relativa a nivel de Orden y Familia en los genotipos susceptible (A) y tolerante (B). Se destaca la presencia de *Bacillales*, *Rhizobiales*, *Rhodospirilliales*, *Xanthomonadales*, *Acidobacteriales*.





**Fig. 3.27:** Orden y familia dominantes: para ambos genotipos tolerante (GT) y Susceptible (GS) en todos los muestreos (ddc).

A fin de observar cambios en la composición y/o estructura de la comunidad bacteriana, considerando un sistema de cultivo sin rotación, es decir sustituyendo, al final de un ciclo productivo (por ejemplo 5 años promedio de vida útil de un cañaveral), la caña de azúcar por una nueva plantación del mismo cultivo, se graficaron en histogramas los órdenes más abundantes en ambos genotipos, GT y GS, en el sistema estudiado, caña-soja-caña y otro sistema de monocultivo caña-caña (Fig. 3.28 A y B). En ambos casos se observa una marcada disminución de *Bacillales*, *Rhizobiales*, *Sphingomonadales* y *Chthoniobacterales* en el sistema caña-caña.

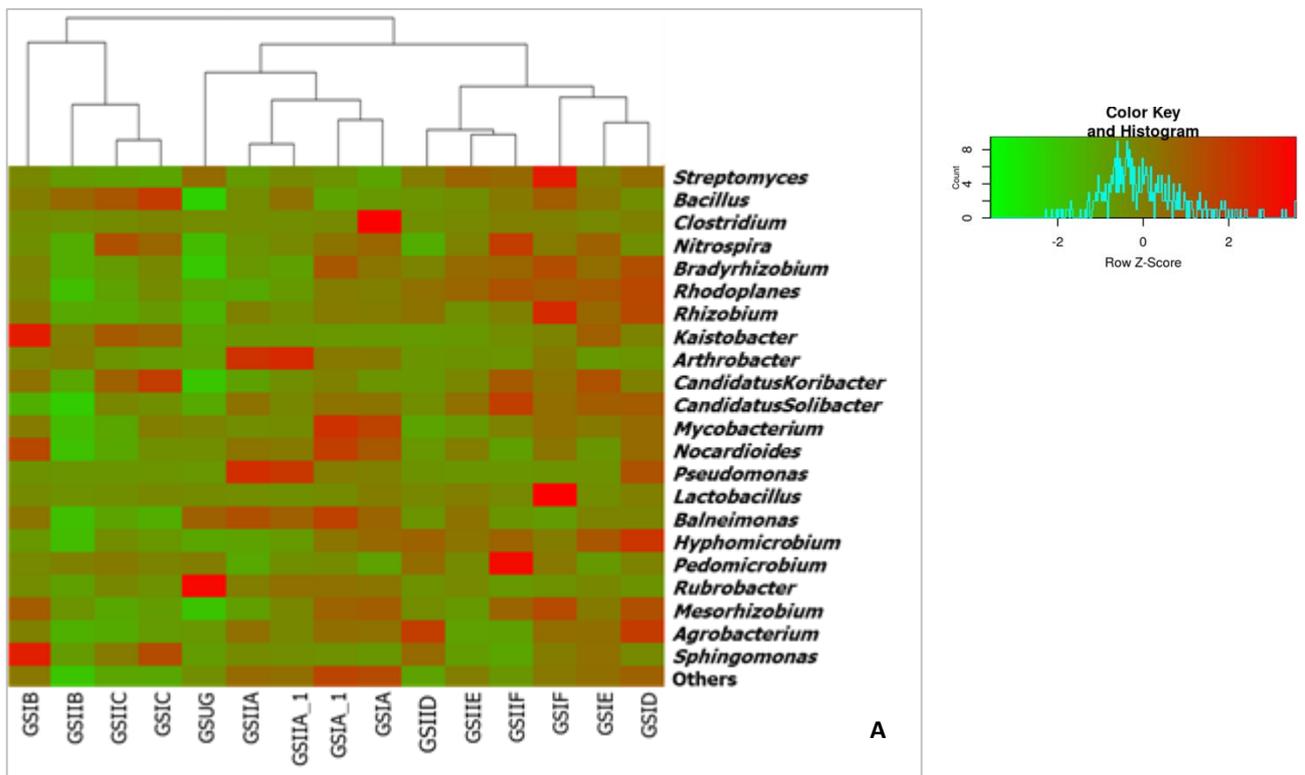


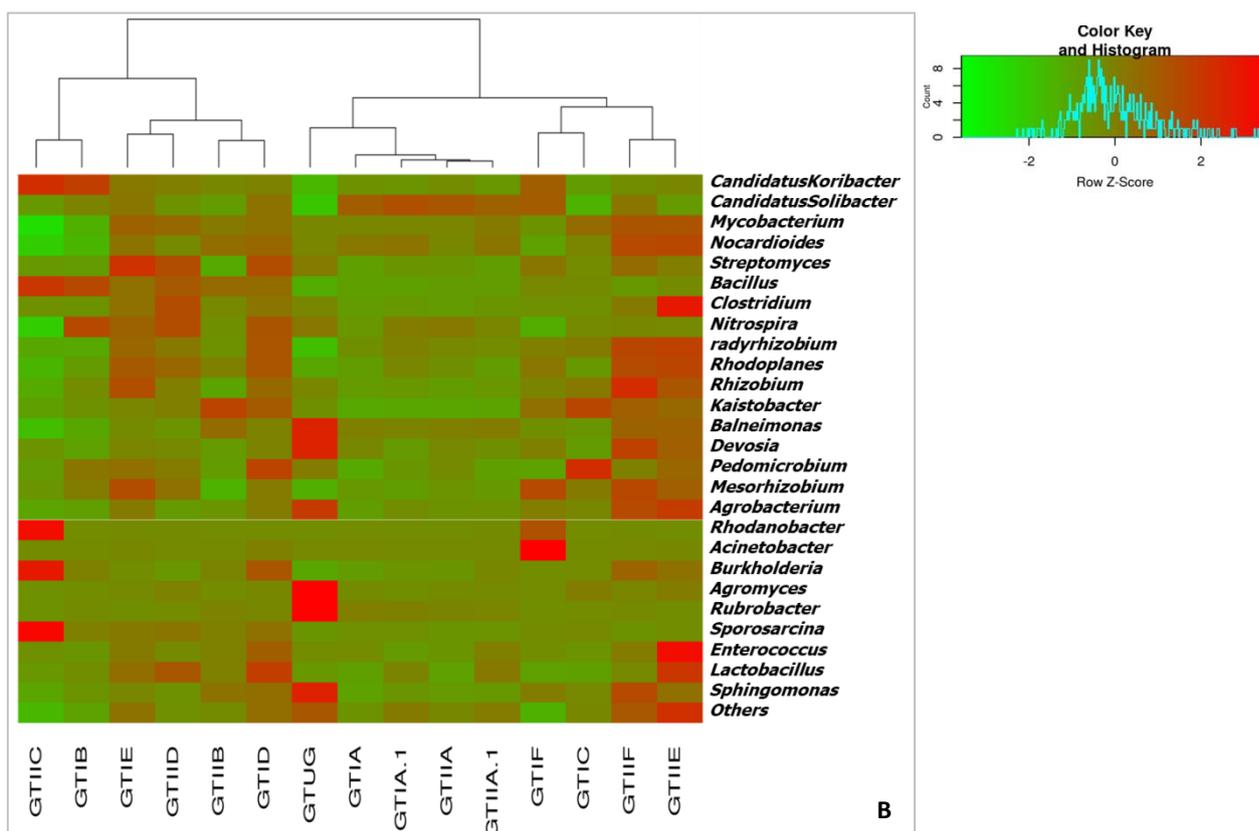
**Fig.3.28. A y B.** Gráfico de ordenes dominantes en el genotipo tolerante (A) y susceptible (B) en muestra de 180 días desde cosecha, donde se contrasta con un control caña-caña.

### III.6.2.3. Diversidad “beta”

Para analizar algunos parámetros de la beta diversidad, como por ejemplo la frecuencia de aparición de los géneros más abundantes entre las muestras evaluadas, se muestra a continuación el grafico “Heatmap” (Fig. 3.29 A y B).

En ambos genotipos analizados se observan la presencia de tres *cluster* principales donde se agrupan las muestras según el tiempo de muestreo, indicando una posible asociación entre la composición y el ciclo del cultivo.





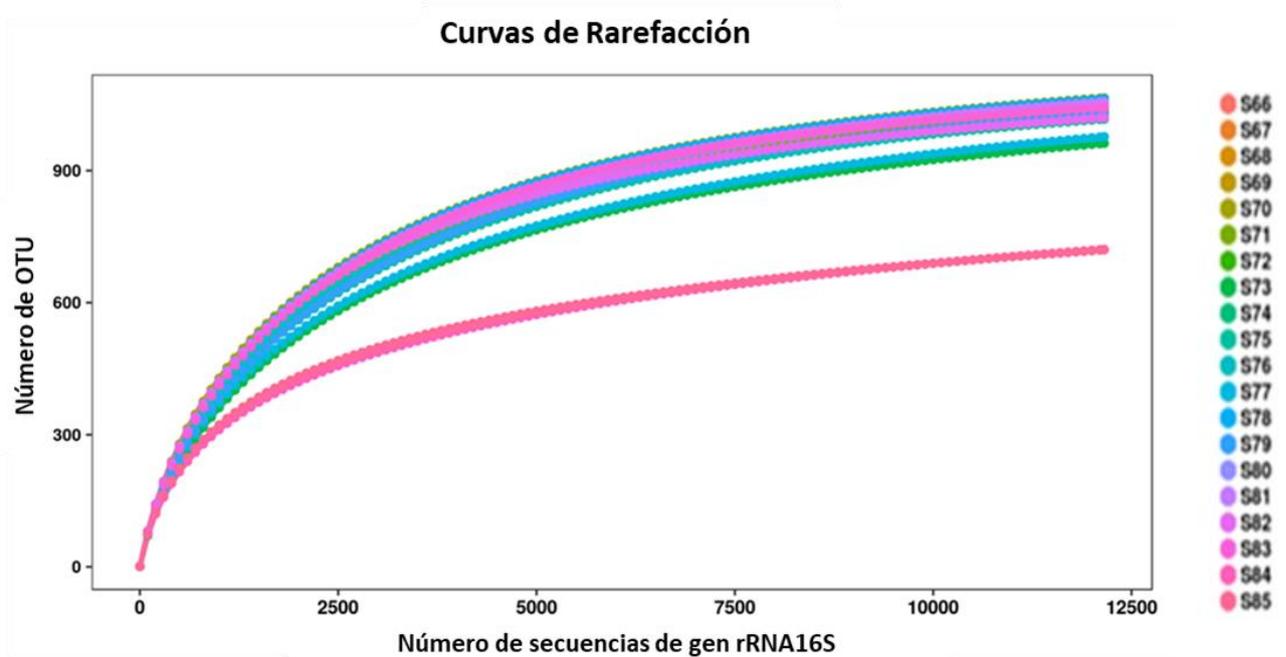
**Fig.3.29.** A: Heatmap con los géneros más abundantes para el genotipo susceptible (GS) y B: los géneros más abundantes para el genotipo tolerante (GT) en todos los tiempos de muestreo caña-soja más control único caña-caña GSUG y GTUG respectivamente.

### III. 6.2.3.1. Análisis comparativos de la composición microbiana

Las muestras fueron normalizadas por rarefacción (Fig. 3.30) a 12155 secuencias por muestra (la muestra con el menor número de secuencias), la cantidad y calidad de las secuencias fue suficiente para describir la biodiversidad presente (las curvas alcanzan la meseta). Las curvas además indican que no hay grandes diferencias en la diversidad  $\alpha$  entre las muestras. Los valores de diversidad  $\alpha$  (índices InvSimpson, Shannon y Chao) se analizaron después de la normalización utilizando Mothur versión 1.39.5 (Schloss et al., 2009) (Tabla 3.6).

La Fig. 3.31 muestra la abundancia a nivel de *Phylum* en las veinte (20) muestras normalizadas.

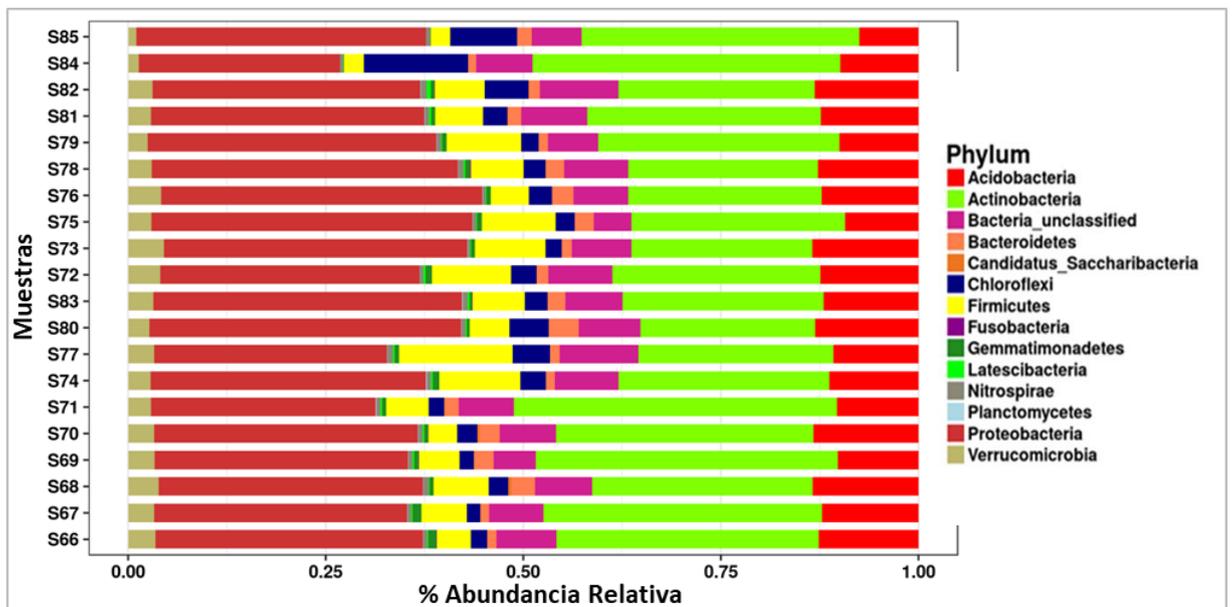
El paquete R DESeq2 (Love et al., 2014) se usó para identificar qué OTU cambian significativamente entre los genotipos tolerantes y susceptibles. Las OTUs que mostraron valores de P ajustados  $\leq 0,01$  y un cambio de pliegue  $\geq 1$  se consideraron significativamente diferentes en cuanto a su abundancia. En base a estos valores de umbral, observamos 202 OTUs representadas diferencialmente entre estas dos condiciones de aproximadamente 1200 OTUs totales (dato no mostrado).



**Fig. 3.30.** Curvas de rarefacción donde se observa el número de secuencias por muestra y número de OTUs.

**Tabla 3.6.** Resumen de resultados de diversidad alfa. Rojo = genotipos tolerantes; Amarillo = genotipos susceptibles. En recuadros se remarcan las muestras para ambos genotipos en condiciones de monocultivo con marcada disminución de OTUs.

Condición	Muestra	Nºde OTUs	InvSimpson	Chao	Shannon
GTIA	S66	1038	168.80	1119.39	6.03
GTIIA	S67	1017	115.56	1094.83	5.89
GTUG	S85	720	120.62	883.28	5.53
GTIE	S72	1027	110.39	1126.51	5.80
GTIF	S73	962	72.71	1099.26	5.53
GTID	S74	1017	91.99	1108.84	5.74
GTIIE	S75	1018	99.87	1094.67	5.75
GTIIF	S76	1025	106.02	1137.05	5.84
GTIID	S77	977	97.07	1100.38	5.66
GSIA	S68	1052	151.00	1123.02	6.01
GSIIA	S69	1031	42.47	1100.71	5.59
GSIA	S70	1065	131.96	1141.52	5.99
GSIIA	S71	1036	43.18	1129.80	5.64
GSIE	S78	1063	131.95	1148.99	5.95
GSIF	S79	1028	89.99	1090.92	5.69
GSID	S80	1050	158.48	1142.66	6.00
GSIIE	S81	1056	158.26	1137.69	5.99
GSIIF	S82	1020	147.55	1094.65	5.96
GSIID	S83	1043	128.33	1094.44	5.91
GSUG	S84	721	99.38	859.49	5.44

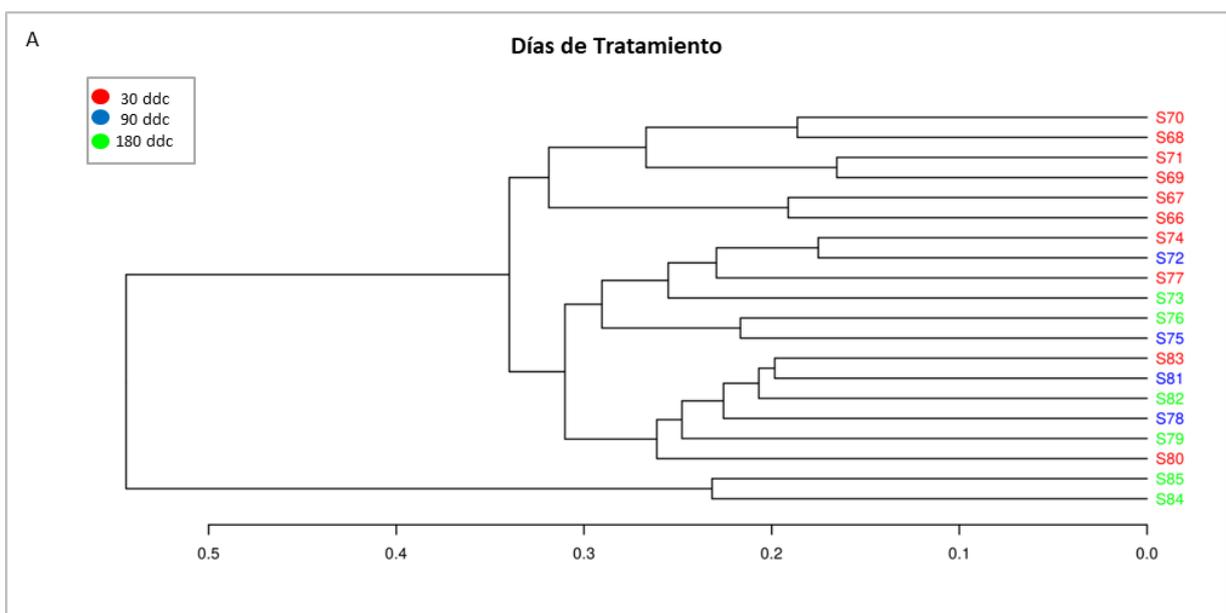


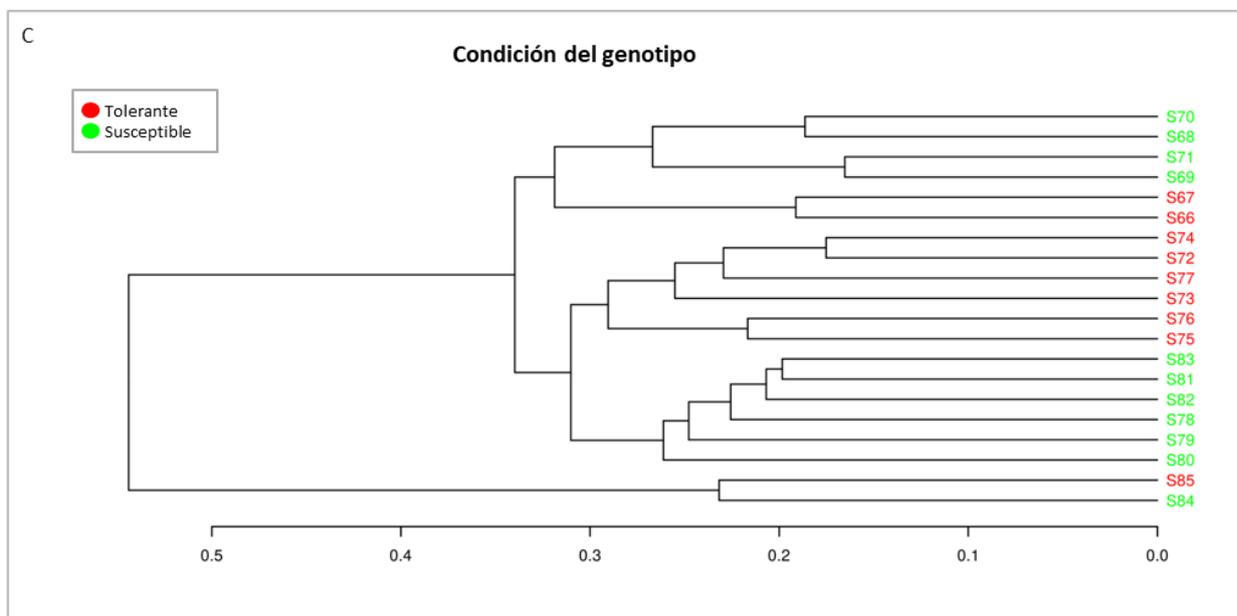
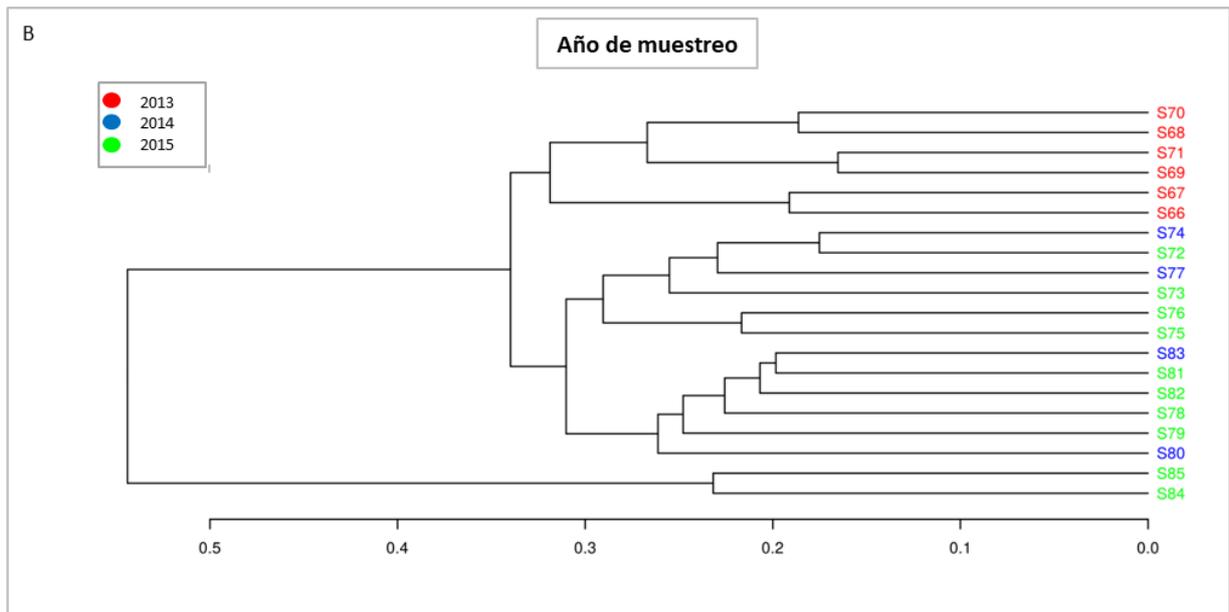
**Fig. 3.31.** Bar Plot donde se muestra la abundancia de Phylum de las distintas muestras.

En los siguientes gráficos se muestran los análisis de *cluster* de las muestras a fin de observar el agrupamiento de las mismas en base a las distintas variables analizadas. El color indica la época de muestreo expresada como días desde cosecha (30, 90 y 180 ddc) (Fig. 3.32 A), el año de cultivo, como año calendario (Fig. 3.32 B), y condición del genotipo, tolerante o susceptible (Fig.3.32 C). En todos los casos, el análisis muestra que, cuanto más parecido es el microbioma, más se agrupan las muestras.

En el caso particular según la condición del genotipo (C), se observa un *cluster* único donde se agrupan todas las muestras de GT, mientras que las que provienen del GS, se subdividen en dos grupos, las muestras que provienen de octubre del año 1, (30 ddc soca 1) son las únicas que se agrupan en la parte superior, mientras que en el segundo grupo se encuentran mezcladas las muestras de 90 y 180 ddc. En la Fig. 3.36 A también se agrupan mayormente las muestras de 30ddc y en la Fig. 3.36 B las de 2013 como mostrando más similitud entre ellas que con el resto.

Las muestras S84 (GS)) y S85 (GT) que provienen del sistema de monocultivo, siempre se muestran en un *cluster* único y separado del resto, evidenciando el microbioma tan diferente en contraste con el sistema con rotación.

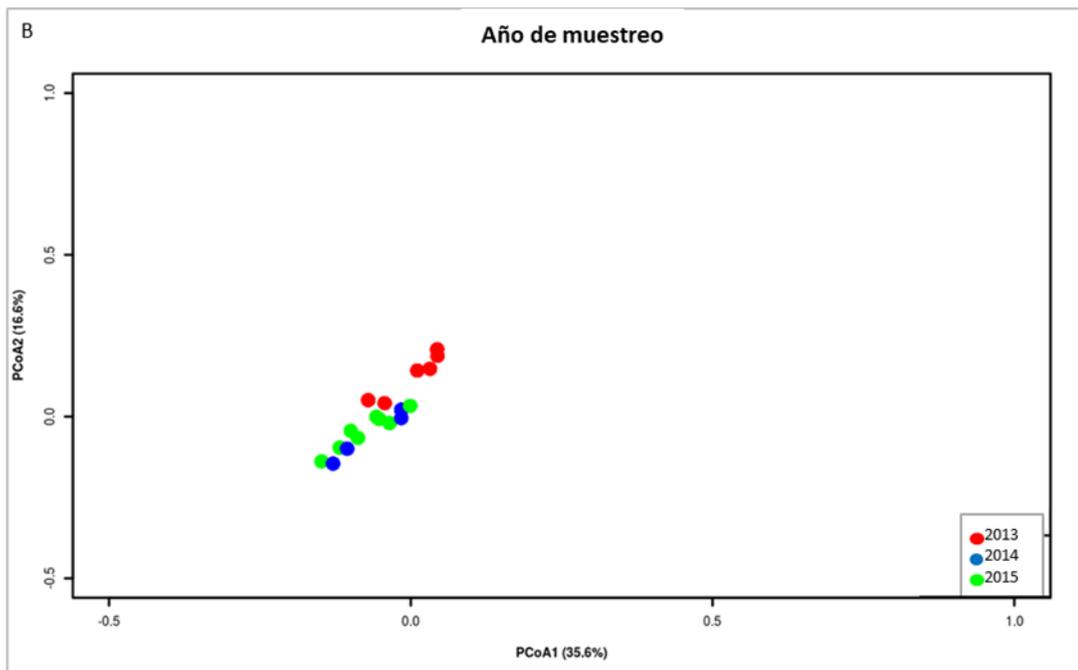
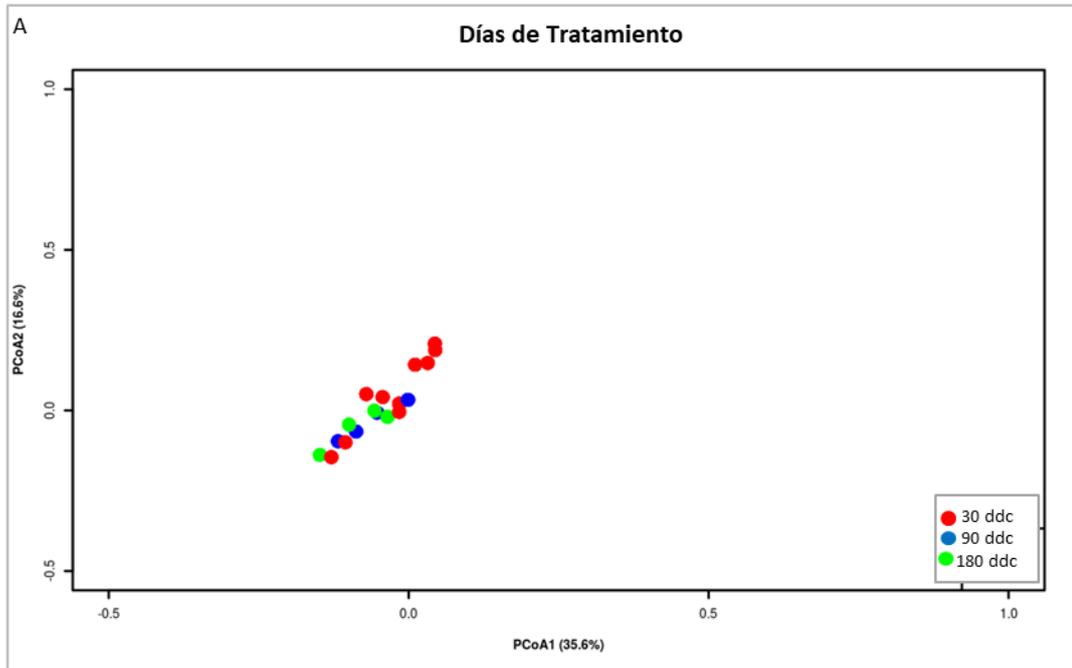


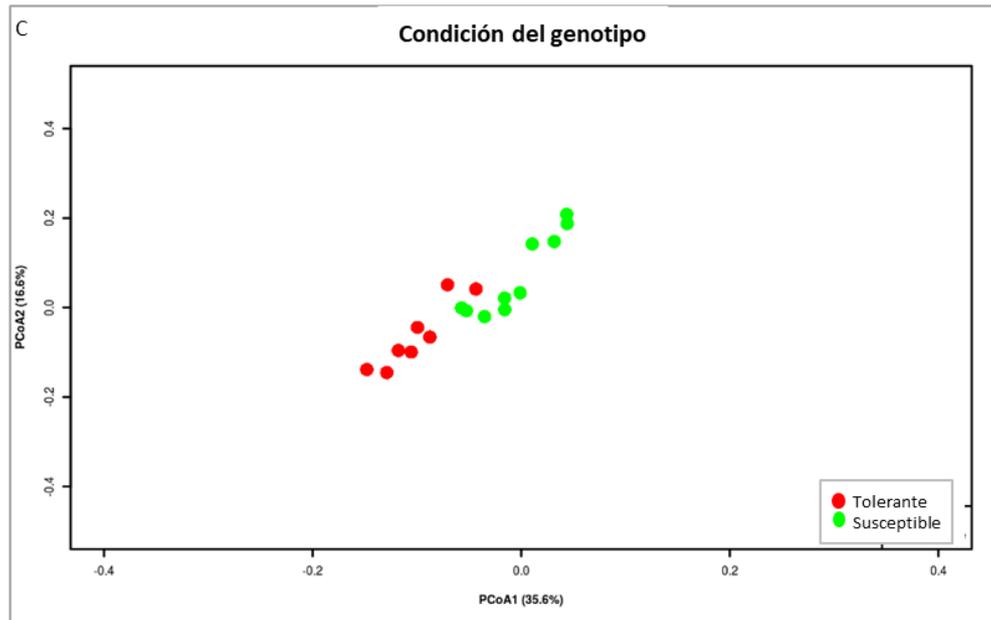


**Fig. 3.32.** Analisis de *cluster* de las muestras utilizando el índice de Bray Curtis y el algoritmo UPMGA. **A.** Por época de muestreo expresada en días desde cosecha (ddc) **B.** Por año según ciclo de cultivo, expresado en año calendario (2013, 2014 y 2015); y **C:** según la condición del genotipo (tolerante y susceptible).

Del análisis de coordenadas principales (PCoA) en la Fig. 3.33 A y B puede observarse que las muestras son muy similares a este nivel de análisis, quizás las diferencias se refieren más a las muestras recolectadas en 2013 en comparación con las de 2014 y 2015 que son más similares entre sí.

Cuando analizamos la condición del genotipo (Fig. 3.33 C), vemos que las muestras que provienen del genotipo tolerante tienen a agruparse por un lado mientras que las del susceptible se agrupan por otro, aunque algunas aparecen entremezcladas, mayormente cada condición de genotipo toma una distribución bien diferenciada, indicando una composición microbiana diversa entre ellas.

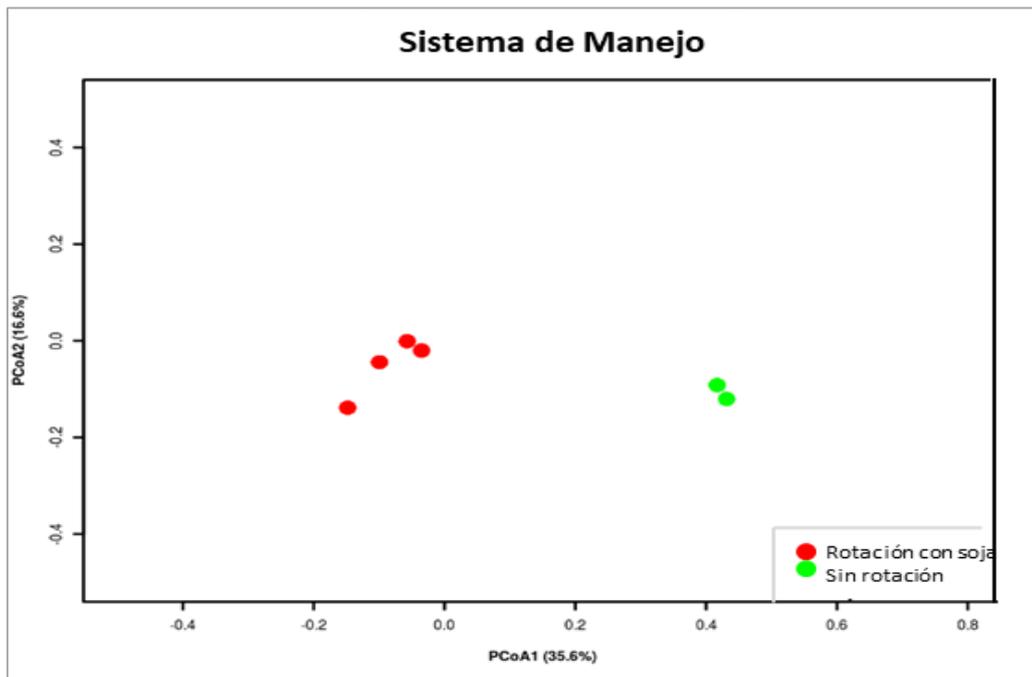




**Fig. 3.33.** Análisis de coordenadas principales (PCoA). **A:** Por época de muestreo expresada en días desde cosecha (ddc) **B:** Por año según ciclo de cultivo, expresado en año calendario (2013, 2014 y 2015) y **C:** según la condición del genotipo (tolerante y susceptible).

En el análisis de coordenadas principales (PCoA), para seis muestras correspondientes al tratamiento de 180 días desde cosecha y del ciclo de cultivo 2014-2015, donde se contrastan sólo los sistemas de cultivo, con rotación y sin rotación con soja, en ambos genotipos, tolerante y susceptible (Fig.3.34).

El análisis pone en evidencia que las comunidades microbianas son muy diferentes entre un sistema y otro, las muestras forman dos grupos claramente distinguibles y lejanos entre sí.



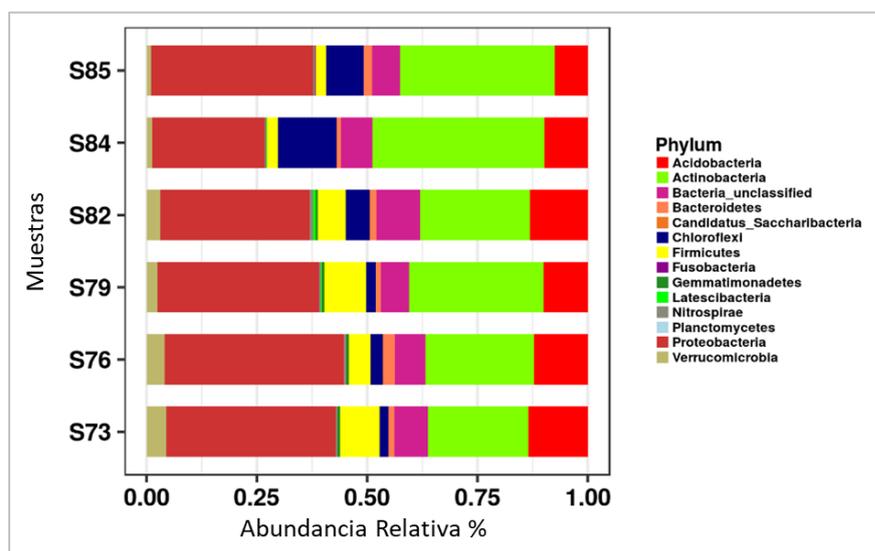
**Fig. 3.34.** Analisis de coordenadas principales (PCoA) según un sistema de manejo con y sin rotación con soja.

Cuando analizamos los datos de alfa diversidad para estas muestras encontramos valores que indican menos biodiversidad en el sistema sin rotación y valores que indican mayor riqueza en las muestras del suelo con rotación (Tabla 3.7). Particularmente observamos una disminución del phylum *Fimicutes* y *Gemmatimonadetes* y un aumento del phylum *Chloroflexi* (Fig.3.35) en las muestras del sistema sin rotación. Dentro del phylum *Fimicutes*, hay una importante disminución de *Bacillus* conocidos por la producción de antibióticos y por desempeñar posiblemente, un papel en el control biológico.

El análisis con DESeq reveló la presencia de determinados OTU que están presente en una condición de manejo mientras que no en la otra, dejando nuevamente en evidencia, las diferencias en la composición y estructura que presentan las comunidades microbianas, en ambos sistemas de manejo (Anexo II).

**Tabla 3.7.** Valores de diversidad alfa. Rojo = genotipos tolerantes; Amarillo = genotipos susceptibles. S85 y S84 condiciones de monocultivo para genotipo tolerante y susceptible respectivamente, con marcada disminución de OTUs.

Condición	Muestra	N°de OTUs	InvSimpson	Chao	Shannon
GTUG	S85	720	120,62	883,28	5,53
GSUG	S84	721	99,38	859,49	5,44
GTIF	S73	962	72,71	1099,26	5,53
GTIF	S76	1025	106,02	1137,05	5,84
GSIF	S79	1028	89,99	1090,92	5,69
GSIF	S82	1020	147,55	1094,65	5,96



**Fig. 3.35.** Bar Plot donde se muestra la abundancia de Phylum de las distintas muestras con y sin rotación en 180ddc.



Las especies fitopatógenas de *Acidovorax* causan enfermedades en una amplia gama de cultivos de importancia económica, tanto monocotiledóneos y dicotiledóneos, como el maíz, arroz, avena, caña de azúcar, sandía, melón y orquídeas (Song et al., 2004). Tres subespecies de *A. avenae*: *A. avenae* subsp. *avenae*, *A. avenae* subsp. *cattleyae* y *A. avenae* subsp. *citrulli* fueron descritas por Willems et al. (1990); Willems y Gillis (2015). Sin embargo, la reclasificación propuesta por Schaad et al. (2008), que eleva a nivel de especie las tres subespecies de *Acidovorax* y propone como nueva especie *A. oryzae* para las cepas de arroz, es ampliamente aceptada en la comunidad científica (Silva et al., 2016; Yan et al., 2017; Yan et al., 2013, Li et al., 2018).

Debido a la estrecha relación filogenética entre estas especies, una correcta caracterización, identificando la diversidad genética entre los aislados de esta bacteria tiene un impacto fundamental en la epidemiología de las enfermedades infecciosas que causan. En este sentido, las tecnologías moleculares han sido de gran ayuda, siendo ampliamente utilizadas para una adecuada identificación (Walcott et al., 2000; 2004, Noller et al., 2003).

En el presente trabajo de tesis doctoral, se aisló e identificó *Acidovorax avenae*, agente causal de estría roja, a partir de hojas con sintomatología típica, provenientes de diferentes zonas cañeras del Noreste y Noroeste Argentino (NEA y NOA).

La estría roja de la caña de azúcar es una enfermedad bacteriana distribuida en todas las áreas productoras del mundo. En Argentina, se ha observado en los últimos 15 años la aparición de infecciones graves en genotipos de caña de azúcar susceptibles, convirtiéndola en una enfermedad principal de caña de azúcar en nuestra zona de cultivo. La principal estrategia adoptada actualmente para controlar esta enfermedad, después de repetidos ciclos de infección, es el reemplazo de variedades susceptibles por variedades que muestren elevada tolerancia al patógeno. Debido a esto, el conocimiento sobre la diversidad genética entre los aislados *A. avenae* es un factor importante a considerar para optimizar la selección de materiales en los programas de mejoramiento genético de la caña de azúcar.

En este trabajo de tesis, la identificación y caracterización del patógeno se llevó a cabo mediante la combinación de técnicas de microbiología clásica, con métodos moleculares rápidos y eficaces. Durante el proceso de aislamiento bacteriano, se observó el predominio de dos tipos de colonias: una de color blanco-crema, circulares, translúcidas, de bordes lisos, que respondían a la morfología típica descrita para *Acidovorax* (Jones et al., 2001, Martin y Wismer, 1989) y otras amarillas, circulares, de bordes lisos y uniformes, morfología similar a algunas especies de *Xanthomonas* (Schaad et al., 2001). En estudios precedentes, Schaad et al., (2001) y Jones et al., (2001) revelaron las dificultades para la identificación de bacterias patógenas de plantas a nivel de especie o subespecie empleando únicamente pruebas fenotípicas clásicas. Esto puede ser especialmente aplicable para las especies de *Acidovorax*, las cuales fueron identificadas mediante la combinación de pruebas fenotípicas y de patogenicidad, las que resultaron tediosas y poco exactas. Géneros tales como, *Erwinia* y *Pantoea*, junto a algunas especies de *Pseudomonas*, como *P. fluorescens* y *P. putida* han sido mencionados en algunos trabajos como bacterias epífitas que coexisten con los organismos en estudio dificultando seriamente su aislamiento, debiendo recurrir para su discriminación al uso de medios muy selectivos (Song et al., 2000), no siempre disponibles para la especie en estudio y a pruebas de patogenicidad, que insumen mucho tiempo (Song et al., 2003).

Mediante el uso de cebadores específicos, descritos para esta especie (Song et al., 2003) se optimizaron reacciones de PCR especie-específica utilizando ADN proveniente de cultivos puros. Estos cebadores han sido desarrollados para una rápida identificación de todas las especies de *A. avenae* y han sido ensayados en más de 46 cepas de *A. avenae* subsp. *avenae* a partir de avena (*Avena sativa*), maíz (*Zea mays*), arroz (*Oriza sativa*), caña de azúcar (*Saccharum* spp.) y mijo (*Penicetum* sp.) (Song et al., 2003).

Para investigar las relaciones genéticas entre las cepas de *A. avenae* aisladas, 31 cepas de diferentes variedades de caña de azúcar infectadas con estría roja en 2008, 2013 y 2014, en cuatro provincias del norte de Argentina, fueron analizadas mediante RAPD-PCR. El análisis de *clusters* agrupó las cepas

en tres grupos principales. Sobre la base de los perfiles de RAPD, se observó una marcada diversidad intraespecífica entre cepas de *A. avenae* aisladas de diferentes variedades de caña de azúcar. En estudios previos, Fontana et al. (2013), detectaron la presencia de cepas de *A. avenae* adaptadas a un determinado genotipo de caña de azúcar, cuando analizaron por RAPD cepas de *A. avenae* de Tucumán y Salta (región noroeste), que se agruparon en dos grupos principales por su origen geográfico. Mediante este análisis en este trabajo, no se observó una asociación geográfica clara, tal vez debido a la mayor y diferente área de muestreo.

La región Noroeste es la mayor productora de caña de azúcar, que contiene el 98% del total de hectáreas cultivadas en Argentina (Benedetti 2018). La región Noreste (Santa Fe y Misiones), debido a la creciente demanda de caña de azúcar para su uso como biocombustible, se considera un área de producción en expansión con un gran potencial (Wallberg y Minetti 2015), con pequeños productores que cultivan a menudo, diferentes variedades de caña de azúcar, en busca de seleccionar la mejor adaptada, representando una fuente diferente y más diversa de cepas de *Acidovorax avenae*.

La combinación de PCR especie-específica como ensayo selectivo preliminar, seguido del análisis mediante perfiles de RAPD como método rápido y preciso fue aplicada con éxito en el análisis de distintos patosistemas para una correcta identificación de los aislamientos (Fontana et al., 2013, Mannulis et al., 1994, Pooler et al., 1996). La aplicación de RAPD-PCR brindó una rápida y consistente discriminación, entre las cepas de *A. avenae* de caña de azúcar analizadas permitiendo seleccionar las cepas más representativas de diferentes genotipos de caña de azúcar, que cubren todas las áreas de producción, para explorar su diversidad genética aplicando un esquema MLST descrito por Feng et al.,(2009). Para comprender las relaciones filogenéticas entre especies de *Acidovorax*, se incluyeron secuencias de MLST de otras cepas provenientes de diferentes huéspedes y orígenes geográficos. El análisis MLST mostró que las cepas de la caña de azúcar se agruparon en un *cluster* único y tienen un origen relativamente reciente y un comportamiento clonal que sugiere la especificidad

del huésped. Tal especificidad cepa-hospedante, se observó también en diferentes aislados de *Acidovorax* para otros cultivos como las *Cucurbitaceas* (Yan et al., 2017). En coincidencia con lo informado por Feng et al. (2009) y Yan et al. (2013), no se observó asociación estadísticamente significativa entre la ubicación geográfica y el genotipo de cepas de *A. avenae* de este estudio. Además, el análisis de *clusters* mostró que las cepas *A. avenae* de caña de azúcar se agruparon separadamente respecto de las cepas *A. avenae* subsp. *citrulli* de sandía y de melón, pero más cerca de otras *A. avenae* subsp. *avenae* provenientes de otras especies de *Poaceae* (mijo, arroz, vasey grass y sorgo). El análisis de perfiles alélicos de siete “housekeeping genes”, definió cinco ST entre las quince cepas de *A. avenae* la caña de azúcar analizadas; la mayoría de ellos fueron tipificados como ST1 (que contienen cepas de Misiones, Tucumán, Salta y Santa Fe) y ST2 y sus derivados (ST3, ST4 y ST5) que contienen cepas de Santa Fe, Tucumán y Salta (Fig. S2). Podría inferirse que los ST dominantes son ST1 y ST2; sin embargo, para obtener información más concluyente sobre los ST más predominante en Argentina sería conveniente contar en un futuro próximo con más aislamientos, incorporando, por ejemplo, las cepas de Jujuy.

Feng et al. (2009) informaron la presencia de dos complejos clonales entre *A. avenae* subsp. *citrulli* con una clara separación de las otras cepas de *A. avenae* subsp. *avenae* y *Acidovorax* spp. De manera similar, el análisis de MLST de un conjunto de 118 cepas de *A. citrulli* de sandía (China) mostró la presencia de tres grupos clonales (Yan et al., 2013). En un trabajo anterior, se propuso un nuevo taxón para las cepas *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* aisladas de arroz: *A. oryzae* (Schaad et al., 2008); sin embargo, en el presente análisis se observa que *A. oryzae* está estrechamente relacionado con cepas de *A. avenae* subsp. *avenae* y debería ser clasificada como *A. avenae*.

Se detectó un nivel significativo de “incongruencia filogenética” en *A. avenae* subsp. *avenae*, que sugiere la existencia de frecuente recombinación en algunos complejos clonales. La recombinación entre diferentes linajes ha sido descrita para genes de virulencia en algunas cepas de *A. avenae* que comparten el mismo huésped (Zeng et al., 2017). Este hecho resulta relevante por la

posibilidad de generación de nuevas cepas altamente patógenas en dicho clado, donde la recombinación es frecuente (Feil et al., 1999; 2001). La recombinación en otros patógenos de plantas también fue informada por otros autores. Timilsina et al. (2015) reportaron evidencia de múltiples eventos de recombinación entre *Xanthomonas euvesicatoria* y *X. perforans* indicando cambios en la composición de especies de poblaciones de patógenos bacterianos debido a la propagación global de genotipos dominantes, generando esta recombinación entre especies, un aumento en la diversidad genética en estas poblaciones.

Es importante resaltar que, a pesar de las relaciones muy cercana entre sí, mostradas por MLST, las cepas de *A. avenae* de caña de azúcar exhibieron diferentes grados de severidad en las pruebas de virulencia. Sin embargo, como los factores de virulencia están codificados por genes que mutan más rápido que los genes “housekeeping” (Moxon et al., 1994) esto no resultaría contradictorio e indicaría la existencia de una diversidad genética mucho más relevante que se encuentra oculta al poder de resolución de MLST.

Para investigar la relación entre la diversidad genética y los niveles de severidad de las cepas *A. avenae* T10\_61, S11\_3, S22\_3, SF17\_4 y SF18\_1, cada una tipificada por MLST con un ST diferente y único, se realizaron ensayos de virulencia sobre un genotipo de caña de azúcar susceptible TucCP 77-42. Los resultados mostraron que todos los biotipos de *A. avenae* reprodujeron los síntomas de estría roja en las condiciones de inoculación artificial, resultando las cepas de *A. avenae* S22\_3 (ST4) y S11\_3 (ST1) de Salta como las más virulentas sobre el genotipo inoculado. Debido a la elevada tolerancia y buen comportamiento que muestra la variedad de caña susceptible (TucCP 77-42) frente a esta enfermedad en cultivo comercial en la provincia de Salta, podría sugerirse un mecanismo de adaptación, ya que, se ha observado además que el genotipo más sensible de Salta (NA 85-1602), también muestra elevada tolerancia a campo frente a las cepas de *A. avenae* de la provincia de Tucumán. Resultados similares fueron reportados por Fontana et al. (2013) cuando se investigó la patogenicidad cruzada de *A. avenae* observando que los síntomas de la estría roja

se desarrollan más temprano en la variedad de caña de azúcar Tucumán (TucCP 77-42) inoculada con cepa patógena de otra provincia.

Recientemente, Silva et al. (2016) informaron una alta variabilidad en la severidad de los síntomas en plántulas de sandía inoculadas con cepas *A. citrulli*, de los haplotipos más representativos en Brasil, determinados por PFGE. La clasificación de la severidad de la enfermedad también se ha utilizado rutinariamente para evaluar la resistencia de la planta hospedadora contra la mancha bacteriana de cucurbitáceas causada por *Acidovorax citrulli* (Bahar et al., 2009; Hopkins y Thompson 2002; Wechter et al., 2011). Serán necesarios más estudios para comprender la relación entre los biotipos y los niveles de virulencia observados.

La ventaja de utilizar métodos de tipificación molecular impacta sobre la capacidad de diferenciación entre organismos relacionados y genéticamente cercanos con un nivel de reproducibilidad adecuado, buen rendimiento y fácil interpretación. MLST demostró ser una herramienta poderosa para determinar el alcance de las diferencias genéticas, ayudando en este caso a inferir las relaciones evolutivas entre las cepas de *Acidovorax*. Sin embargo, se prevé que, en un futuro próximo, los estudios filogenómicos reemplazarán a los análisis de MLST para responder finalmente preguntas filogenéticas y taxonómicas sobre las especies de *Acidovorax* (Giordano et al., 2018).

La reciente descripción de la secuenciación del genoma de *A. avenae* T10\_61 (Fontana et al., 2016), como parte de los resultados de este trabajo de tesis, y estudios comparativos con genomas de otras especies de *Acidovorax* disponibles, constituyen una herramienta fundamental, contribuyendo con valiosa información sobre genes involucrados en los mecanismos de infección y en la interacción con la planta, que ayudarán al mejor entendimiento del patosistema. En relación a esto, trabajos recientes, están trazando un posible camino para el abordaje de esta temática, a través de la búsqueda de proteínas asociadas a los Sistemas de Secreción. Al menos seis distintos sistemas de secreción de múltiples componentes (Sistema de Secreción tipo I - VI, o T1SS - T6SS) son utilizados por los patógenos bacterianos Gram negativos para

transportar las proteínas a través de las membranas de las bacterias y, eventualmente, del huésped (Gerlach y Hensel 2007; Tam et al., 2007). El T6SS es un sistema de secreción de componentes múltiples recientemente descubierto, que a menudo está involucrado en la interacción con huéspedes eucariotas en relaciones patógenas o simbióticas (Filloux et al., 2008). La expresión y función de algunos genes del T6SS, están siendo particularmente estudiados a partir del genoma de *Acidovorax oryzae* RS-1 por su rol tanto en la virulencia como en la supervivencia ambiental de esta bacteria (Li et al., 2018; Cui et al., 2015).

En este trabajo, a partir de un análisis comparativo mediante PanX, de un grupo de 11 genomas de *Acidovorax*, que incluye *A. avenae* T10\_61 de caña de azúcar, y *A. oryzae* RS-1 de arroz, entre otros, se lograron establecer las relaciones filogenéticas presentes en la especie, quedando en evidencia una importante especificidad cepa-hospedante, principalmente para caña de azúcar, y se pudieron explorar proteínas asociadas a los SS, para conocer si la cepa de caña de azúcar comparte los mismos genes con el resto de las *Acidovorax* analizadas.

La necesidad de un abordaje integral del patosistema, como parte de un agroecosistema mayor donde además del binomio, planta-microorganismo, interactúan otros factores que impactan sobre el mismo, impulsó la incorporación del concepto del microbioma de la caña de azúcar. En este sentido, el conocimiento, principalmente, de la estructura y composición de la microbiota del suelo, fue incluido como un indicador para incrementar el conocimiento acerca de la interacción benéfica o no entre los principales componentes microbianos del agro-ecosistema en estudio. El manejo agronómico y cultural de la caña de azúcar en los últimos años, incluye al menos dos características que inciden en el agroecosistema del cultivo; la cosecha en verde (sin quema previa del cañaveral) y la rotación con soja (*Glycine max*) como cultivo antecesor para alternar entre una plantación y otra de caña. Estos aspectos resultan relevantes cuando se presentan cambios o alteraciones en el comportamiento de un determinado patosistema y/o en parámetros epidemiológicos. INTA Famaillá, mediante un monitoreo constante, detectó en los últimos años un aumento en la incidencia de estría roja en caña, causada por *Acidovorax avenae* (Fontana et al.,

2013) asociada a lotes comerciales con mayor prevalencia en la región centro-este y noreste, departamento Cruz Alta y Burreyacú respectivamente (Perez Gomez et al., 2010), donde la soja como cultivo antecesor es una práctica frecuente desde hace más de 10 años (Fandos et al., 2013).

Sobre la base de estas consideraciones, en el presente estudio, se aplicaron técnicas de análisis independientes de cultivo, para estimar la microbiota principal acompañante en un sistema de manejo de caña con rotación con soja y las posibles interacciones con el patosistema *Acidovorax*-caña de azúcar.

Los resultados de DGGE proporcionaron buenos perfiles de comunidades microbianas presentes en muestras de hojas y de suelo de caña de azúcar, con niveles de polimorfismos que fueron más evidentes cuando se analizó ADN total de hojas. Sin embargo, no fue lo suficientemente informativa sobre la composición y diversidad microbiana, ya que los resultados de la secuenciación, solo muestran alto porcentajes de *Bacillus*, como microbiota dominante, endófitos, rizoféricos y algunos asociados a promotores del crecimiento vegetal, aunque ninguno de ellos estudiados ni descritos en profundidad para el sistema de cultivo de caña de azúcar. Muchos autores han relacionado la intensidad de las bandas en DGGE con la presencia en mayor o menor número de determinado microorganismo o especie en general en una matriz compleja como es el caso de los suelos. Usando cebadores universales para el análisis de las comunidades complejas, donde la composición de los microorganismos es desconocida, es muy probable que la población con ventaja numérica sea más fácilmente amplificadas, pudiendo enmascarar aquella/s minoritaria/s. Por esta razón es recomendable el uso de cebadores específicos para determinadas especies o grupos microbianos cuando se requiere confirmar su presencia o cuando se sospecha que su población es minoritaria (Walter et al., 2001). Los métodos moleculares como herramientas en el estudio de comunidades bacterianas se han convertido en un válido soporte de las técnicas tradicionales en microbiología agrícola y ambiental, precisamente aquellos basados en la secuencia del ADNr 16S como técnicas independientes de cultivo. Una de las principales razones para usar técnicas que no requieren el cultivo previo de los microorganismos es la independencia del

conocimiento de las reales condiciones de crecimiento, así como de los requerimientos nutricionales particulares de un dado microorganismo. Las técnicas genéticas pueden proporcionar un perfil o “fingerprinting” que representa la diversidad genética de una comunidad microbiana en un ambiente específico. DGGE es entre las técnicas moleculares independientes de cultivo las más usada para el estudio de la ecología microbiana en diversos ecosistemas (Ercolini, 2004). Las aplicaciones de DGGE en microbiología de la caña de azúcar como una técnica independiente de cultivo para acceder a la estructura total de las comunidades microbianas, han sido mencionada en un importante número de publicaciones. Rachid et al. (2016) reportaron el estudio del efecto de diferentes niveles de residuos agrícolas de cosecha (RAC) sobre las comunidades fúngicas y bacterianas, como también de las variables de química del suelo, observando que la comunidad fúngica resultó más afectada, con cambios estructurales importantes. Asimismo, usando DGGE y mediante la evaluación de genes vinculados al metabolismo de nitrógeno, como *amoA* y *nirK*, fue posible describir significativas diferencias en la estructura de comunidades bacterianas totales, oxidantes de amoníaco y desnitrificantes aplicando diferentes sistemas de manejo de cosecha con quema y sin quema del cañaveral (Rachid et al., 2012). En general, cambios en las estructuras de los grupos funcionales siguen un patrón diferente de las variables físico-químicas, indicando influencia de las interacciones entre diferentes grupos bacterianos en el ciclo del N, enfatizando la importancia de los factores biológicos en la estructuración de estas comunidades (Rachid et al., 2012). De manera similar, Burbano et al. (2011) examinaron la actividad de comunidades diazotróficas en raíces de caña empleando una combinación de RT PCR y DGGE encontrando un alto porcentaje de transcriptos de gen *nifH* relacionado con la presencia *Rhizobium rosettiformans* en la fijación del N<sub>2</sub> sin formación de nódulos. En concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo, otros autores reportaron muy bajos niveles de diversidad a partir de los perfiles DGGE.

Con el advenimiento de las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento se desarrollaron un conjunto de tecnologías genómicas y

herramientas bioinformáticas para acceder directamente al contenido genético de comunidades enteras de organismos. Estos métodos “omicos” (metagenómica, metatranscriptómica, metaproteómica, metabolómica) se han utilizado para describir la estructura taxonómica de las comunidades microbianas en diferentes entornos y para descubrir nuevos genes y enzimas de interés industrial y médico. Estas nuevas herramientas permiten una mejor comprensión de la diversidad taxonómica microbiana de una comunidad, así como establecer su función a los fines de responder a las siguientes preguntas “¿quiénes están allí?” y “¿qué están haciendo?”(Genti de Raimondi, 2013).

En vista de enriquecer y profundizar el conocimiento de las comunidades microbianas en el sistema en estudio, como estrategia adicional, se propuso implementar el análisis metagenómico de las muestras de suelo en un agroecosistema de cultivo de caña de azúcar. Los resultados informados en esta tesis, describen por primera vez la composición microbiana de un suelo de caña de azúcar basado en la tecnología de secuenciación de alto rendimiento (HTS). Los indicadores de riqueza y abundancia para cada muestra analizada fueron adecuados para describir la biodiversidad presente en el sistema en estudio. Tanto las curvas de rarefacción como los valores de alfa diversidad, también dejaron en evidencia que no hay demasiadas diferencias entre las muestras, a nivel de genotipos, de sistemas de cultivo ni de época de muestreo, aunque cuando se identificaron los órdenes más abundantes, se observó un ligero aumento en la abundancia de *Sphingomonadales*, *Bacillales* y *Rhizobiales* en el genotipo tolerante (GT) en los muestreos 90 y 180 ddc en ambas campañas, como así también una marcada disminución de *Bacillales*, *Rhizobiales*, *Sphingomonadales* y *Chthoniobacterales* en el sistema caña-caña a los 180 ddc para ambos genotipos.

Souza et al. (2016) informaron que los grupos a los que pertenecen diazótrofos de vida libre, como *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, descritos como promotores del crecimiento vegetal (PGPB) en la mayoría de las plantas, se presentan como componentes secundarios del microbioma de la caña de azúcar, y en general, también se observaron en bajo número en las muestras analizadas en el presente trabajo.

Con el fin de obtener indicadores de diferencias más significativos, se realizó un análisis comparativo de las muestras “normalizadas” donde se observó mayor biodiversidad en el sistema con rotación, si bien los beneficios de las rotaciones en los cultivos han sido ampliamente estudiados por las mejoras en la estructura, física y química del suelo, el aspecto microbiológico no ha sido frecuentemente abordado. Los datos generados en este estudio, constituyen un avance importante en el conocimiento de los beneficios “no siempre visibles” de las rotaciones en los sistemas agrícolas y particularmente en caña de azúcar.

Cuando intentamos relacionar la composición microbiana con la respuesta a estría roja, en los genotipos tolerante y susceptibles, dentro del sistema en estudio, se pudo observar que sí existen diferencias en la microbiota asociada a una y otra condición del genotipo, pudiendo esto constituir o no una asociación con la respuesta a la enfermedad. En este aspecto se requieren estudios más profundos y orientados a los posibles mecanismos involucrados en respuesta por parte de la planta.

Los trabajos de metagenomas de la caña de azúcar son relativamente recientes, y sin duda aportarán una gran cantidad de datos que ayudarán a la comprensión de procesos que aún resultan desconocidos y eventualmente responderán algunos interrogantes acerca de la funcionalidad y roles de las comunidades microbianas en los sistemas estudiados.

La posibilidad de relacionar la microbiota de caña de azúcar con factores como variedad, ciclo del cultivo o una determinada enfermedad, también ha sido objeto de estudio de otros grupos de investigadores de importantes regiones cañeras del mundo. Recientemente, Amontas et al. (2018) demostraron que múltiples factores interactúan de manera compleja en las comunidades de cada parte de la planta. Las diferentes asociaciones de grupos de bacterias y hongos fueron determinadas principalmente por la parte de la planta analizada, seguido por la región de cultivo, la edad del cultivo, la variedad de caña de azúcar y por el síndrome de amarillamiento de las hojas o *Yellow Canopy Syndrome* (YCS). Asimismo, se observó que las comunidades bacterianas de raíces y suelo de rizosfera están más influenciadas por la región de cultivo, mientras que las

comunidades bacterianas del tallo y hojas, están mayormente afectadas por la variedad y edad del cultivo. El 34% de los 676 OTUs bacterianos pertenecientes al microbioma central de al menos un tipo de muestra pudo ser clasificado a nivel de género, y solo el 9,5% de las OTU bacterianas centrales se clasificaron a nivel de especie (Hamonts et al., 2018). Tomando como objeto de análisis, germoplasma ancestral de caña de azúcar y variedades comerciales, la evaluación de la influencia del genotipo en los perfiles de bacterias endofíticas de raíces durante el período de rápido crecimiento mediante 16S rRNA y amplificación del gen *nifH* y en base a los índices de diversidad alfa y beta se demostró que el genotipo de la caña de azúcar influyó significativamente en la estructura de la comunidad bacteriana (Dong et al., 2018). El primer trabajo exhaustivo con un enfoque de “microbioma” en caña de azúcar, fue realizado por Souza et al. (2016) en diferentes órganos de la caña de azúcar (raíces, tallos y hojas de plantas cultivadas en suelo de invernadero y una sola variedad) y el acceso por separado a sus compartimentos exofíticos y endofíticos. Los resultados indicaron que más del 90% de todos los OTUs presentes en raíces, tallos y hojas también estuvieron presentes en las muestras de suelo a granel. La colonización de la planta en las primeras etapas de desarrollo, así como la riqueza y abundancia específica del órgano puede estar dictada por la interacción funcional o adaptativa planta-microbio. La riqueza de OTUs disminuyó a medida que pasaban de muestras subterráneas a compartimentos exofíticos y endofíticos de órganos de plantas sobre el suelo. Asimismo, en la mayoría de los trabajos recientes, los autores coinciden en la necesidad de conducir la investigación centrada en las funcionalidades de los grupos microbianos en lugar de las relaciones taxonómicas de las comunidades microbianas (Hamonts et al., 2018).

Enfoques basados en el microbioma de cultivos de importancia económica están siendo desarrollados en la actualidad. En particular para caña de azúcar, el aprovechamiento del potencial de los microorganismos presentes en el microbioma constituye un gran desafío, basado en la importancia y necesidad de aumentar la productividad de manera sostenible (Souza et al., 2016; Paungfoo-Lonhienne et al., 2016; Yeoh et al., 2016). Por otra parte, la comprensión de los

cambios en el microbioma de la caña de azúcar en relación a alguna determinada enfermedad, proporcionaría datos importantes que permitiría a largo plazo la identificación de posibles estrategias de gestión para un determinado patógeno, incluido un programa ajustado de mejoramiento, o una mejor predicción de los resultados de manejo (Hamonts et al., 2018). La mayoría de las plantas de cultivo crecen en estrecha asociación con las comunidades microbianas, las cuales pueden dividirse en tres grupos, endofítico, epífito o estrechamente asociado. Las plantas se benefician de estas relaciones, por ejemplo, con nutrientes claves que se modifican en formas más utilizables para los microbios antes de ser asimilados por las plantas (Long, 1989; Bolan, 1991; Zhang et al., 2009). A su vez, las plantas proporcionan metabolitos carbonados como exudación de la raíz a los endófitos y bacterias en la rizosfera (Bais et al., 2006; Lopes et al., 2016). Las comunidades microbianas asociados a las plantas también pueden proteger a fitopatógenos (Innerebner et al., 2011), mejoran el crecimiento a través de la producción de fitohormonas (Ali et al., 2009), y ayudar a las plantas frente a diferentes estreses (Dong et al., 2018).

La manipulación de la capacidad de fijación de nitrógeno del microbioma asociado a la caña de azúcar se ha convertido en una alternativa a la aplicación de fertilizantes de nitrógeno y ha sido extensamente estudiado, especialmente para diazótrofos endofíticos (Elbeltagy et al., 2001; Reis et al., 2004; Lin et al., 2014; Souza et al., 2016; Proença et al., 2017). Estudios recientes mostraron que la aplicación de fertilizante nitrogenado no cambió la comunidad microbiana central en cultivares y variedades de caña de azúcar (genotipo de planta) solo tuvieron un sutil efecto en la composición de la comunidad (Yeoh et al., 2016).

Asimismo, si bien entre los diferentes órganos de caña de azúcar no se reportaron cambios en la abundancia de la comunidad endofítica, la riqueza de especies en la microbiota endofítica resultó afectada según resultados informados por Souza et al. (2016).

En base a los resultados obtenidos en esta tesis, podemos inferir que existen diferencias muy importantes en cuanto a la composición y estructura de las comunidades bacterianas en las muestras analizadas, sin duda la rotación con

soja implica una riqueza y abundancia de comunidades que pueden mejorar la condición de fertilidad de la planta y por ende favorecer el desarrollo de enfermedades. Por otro lado, aunque las diferencias son menos significativas entre genotipos, tolerante y susceptible, se observaron algunos parámetros interesantes de analizar en un estudio donde se profundice la funcionalidad de algunos grupos bacterianos, y no solo la composición y cantidad.

Los microbios asociados con la caña de azúcar se han estudiado en el pasado mediante aislamientos bacterianos directos de las raíces usando medios de cultivo definidos. Aunque esta estrategia ha llevado al aislamiento de bacterias potencialmente relevantes, para la comprensión particular de la fijación de nitrógeno asociada a plantas, ha limitado los estudios a un pequeño número de aislamientos.

El origen del microbioma, la dinámica y los patrones de ensamblaje son importantes para la elucidación de su posible papel en el crecimiento, desarrollo y respuesta de las plantas al estrés biótico y abiótico.

Los datos obtenidos aportan valiosa información para evaluar las posibles interacciones existentes en el sistema en estudio, a fin de determinar la existencia de una relación con el patosistema caña de azúcar-*A. avenae*.

Los grupos más abundantes identificados en este estudio, podrían contener bacterias con funciones biológicas relevantes para el crecimiento de las plantas, y más diversas que los reportados hasta el momento de bacterias asociadas con la caña de azúcar.

**Capítulo V**

---

**Conclusiones**

---

## CONCLUSIONES

- Se aisló *Acidovorax avenae* a partir de hojas con síntomas típicos de estría roja, de las Provincias de Santa Fe, Misiones, Salta y Jujuy, estableciéndose a esta bacteria como único agente causal de estría roja de la caña de azúcar en la Región NOA y NEA de la Argentina.
- Se constituyó una colección de cultivos con más de 40 aislamientos identificados y caracterizados, como resultado de este trabajo de tesis y sumados a los ya existentes en INTA Famaillá provenientes de Tucumán y Salta, completando así el relevamiento de las principales áreas cañera de Argentina.
- El uso de métodos de identificación y caracterización basados en análisis de secuencias, constituyó una herramienta de alto poder discriminatorio y de reproducibilidad, eficiente y confiable para la tipificación de *Acidovorax avenae* de caña de azúcar, lográndose establecer cinco tipos de secuencias multilocus entre los aislamientos analizados, que constituyeron un *cluster* único, de origen cercano y reciente.
- Asimismo, la aplicación de técnicas moleculares de manera combinada, RADP, Multilocus, permitió determinar que *Acidovorax avenae* presenta variabilidad genética entre las muestras provenientes de las provincias de Salta, Tucumán, Santa Fe y Misiones, aunque no se han establecido relaciones significativas con la distribución geográfica de la bacteria, ni con los diferentes genotipos de caña de azúcar analizados.
- Todas las secuencias generadas a partir de los análisis multilocus de este trabajo de tesis, 105 en total, se encuentran depositadas en el banco de datos NCBI (*GenBank*) bajo el número de acceso MF623064 a MF623168, contribuyendo a incrementar la base de datos MLST con los nuevos ST

descriptos para los aislamientos de *Acidovorax* de caña de azúcar, que hasta el momento no habían sido reportados.

- Se reportó la secuenciación del genoma de *Acidovorax avenae*, cepa T10\_61, aislada de la variedad tucumana de caña de azúcar INTA NA 89-686. La misma ha sido incorporada al banco de datos mundial NCBI (GenBank) bajo el número de acceso NZ\_LJGO00000000.1 y al Sistema Nacional de Datos Genómicos (SNDG) de MINCyT de Argentina. Esto representa el primer genoma registrado para esta especie a partir de un aislamiento de caña de azúcar.
- La secuencia del genoma de *A. avenae* descrita en esta tesis muestra una elevada especificidad cepa-hospedante determinada en los estudios comparativos con otros genomas de *Acidovorax* disponibles. Este dato soporta y da mayor relevancia a los resultados obtenidos mediante el análisis MLST.
- La variabilidad genética que se reporta en esta especie tiene un gran significado a la hora de realizar un manejo más efectivo del cultivo de caña de azúcar, pues el uso de variedades resistentes a las cepas predominantes es el único método de control descrito hasta el presente para esta patología.
- Los biotipos diferentes de *A. avenae* evidenciaron diferencias en la virulencia y/o agresividad entre ellas.
- Las técnicas moleculares independientes de cultivo, a partir del análisis de ADN total de suelo y hoja, permitieron estimar la composición de la microbiota presente en un sistema de cultivo de caña de azúcar con rotación con soja, constituyendo estos análisis los primeros reportados

para el agroecosistema en estudio, bajo un enfoque de secuenciación de alto rendimiento.

- El conocimiento de la microbiota presente, y su posible interacción con el patosistema en estudio, caña de azúcar-*Acidovorax*, constituye un punto de partida para el diseño de estrategias de manejo de la enfermedad y la regulación de los mecanismos de virulencia del patógeno.
- No se detectó la presencia de *A. avenae* en el suelo estudiado, mediante la aplicación de técnicas independientes de cultivo, confirmando que el suelo no cumple un rol en el ciclo de vida de esta bacteria durante el proceso de infección.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ali, B., Sabri, A. N., Ljung, K., and Hasnain, S. 2009. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. *Lett. Appl. Microbiol.* 48:542-547.
- Almeida, I. M. G. de. 2008. Doenças causadas por Bactérias. En: Cana-de-açúcar. Eds. Miranda E., Vasconcelos A., Landell M. Campinas, São Paulo, Brasil. pp.437-450.
- Almeida, N. F., Yan, S., Cai, R., Clarke, C. R., Morris, C. E., Schaad, N. W., Schuenzel, E. L., Lacy, G. H., Sun, X., Jones, J. B., Castillo, J. A., Bull, C. T., Leman, S., Guttman, D. S., Setubal, J. C., and Vinatzer, B. A. 2010. PAMDB, a multilocus sequence typing and analysis database and website for plant-associated microbes. *Phytopathology*, 100:208-215.
- Alvarez, A. M., Schencks, S. and Benedict, A.A. 1995. Differentiation of *Xanthomonas albilineans* strain with monoclonal antibody reaction pattern and DNA fingerprint. *Plant Pathol. Oxford UK* 46(2):358-366.
- Amann, R. 2000. Who is out there? Microbial aspects of biodiversity. *Syst. Appl. Microbiol.* 23(1):1-8.
- Anderson, D. L., Raid, R. N., Ireby, M. S., and Henderson, L. J. 1990. Association of sugarcane rust severity with soil factors. *Plant Dis.* 74:683-686.
- Atlas, R. 1984. Diversity of microbial communities. In: K.C. Marshall (ed.). *Advances in Microbial Ecology Vol 7* pp 1-47.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, D., Moore, D., Seldman, J., Smith, A., and Struhl, K. 1992. *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York. V.1.
- Bahar, O., Kritzman, G., and Burdman, S. 2009. Bacterial fruit blotch of melon: screens for disease tolerance and role of seed transmission in pathogenicity. *Eur.J. Plant Pathol.* 123:71-83.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., and Vivanco, J. M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 233-266.
- Barnes, L. W. 1994. The role of plant clinics in disease diagnosis and education. A north American Perspective. *Ann. Rev. Phytopathol.* 32:622-626.

- Bassi, D., Puglisi, E., Cocconcelli, P.S., 2015. Understanding the bacterial communities of hard cheese with blowing defect. *Food Microbiol.* 52, 106–118.
- Bertani, R. P., Perera, M. F., Arias, M. E., Luque, C., Funes, C., González, V., Cuenya, M. I., Ploper, L. D., Welin, B., and Castagnaro, A. P. 2014. A Study of the Sugarcane Yellow Leaf Disease in Argentina *Plant Dis.* 98: 1036-1042.
- Bolan, N. S. 1991. A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants. *Plant Soil* 134, 189–207.
- Burbano, C. S, Liu, Y, Rösner, K. L, Reis, V. M, Caballero-Mellado, J, Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T. 2011. Predominant nifH transcript phylotypes related to *Rhizobium rosettiformans* in field-grown sugarcane plants and in Norway spruce. *Environ. Microbiol. Rep.*3(3):383-9.
- Cadena Zamudio, J. D., Martínez-Peña, M. D., Guzmán-Rodríguez, L. F., Arteaga-Garibay, R. I. 2016. Aplicación de secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. *Agroproductividad.* 9(2): 70- 83.
- Centro Azucarero Argentino: Disponible. en línea: <http://centrozucarero.com.ar/oldsite/zafas/zafra2016.html>. Activo mayo 2018.
- Cocconcelli, P., Porro, D., Galandini, S., and Senini, L. 1995. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.* 21:376-379.
- Cottrell-Dormer, W., 1926. Notes and observations on the red streak associated with Queensland top rot disease. *Queensl. Agric. J.*, 25:406-414.
- Cottrell-Dormer, W., 1932. Res stripe disease of sugarcane in Queensland. *Bull. Bur. Sugar Exp. Stn Div. Pathol.* 3: 25-59.
- Cui, Z., Jin, G., Li, B., Kakar, K., Ojaghian, M., Wang, Y., et al. 2015. Gene Expression of Type VI Secretion System Associated with Environmental Survival in *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* by Principle Component Analysis. *Inter. J. Mol. Scien.* 16:22008–22026.
- Dhkal, M., Hunjan, M. S., Kaur, H., and Singh Pannu, P. P. 2018. Characterization of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* causing bacterial leaf streak of maize in Punjab state of India. *J. Plant Pathol.* DOI: 10.1007/s42161-018-0138-3.

- Ding, W., Baumdicker F., Neher R. A. 2016. panX: pan-genome analysis and exploration. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/072082>.
- Diamante, A., e Izquierdo, J. 2004. Manejo y gestión de la Biotecnología Agrícola apropiada para pequeños productores: estudio de caso Argentina. Estudio de Caso REDBIO/FAO. Disponible en la Internet: [http://www.redbio.org/estud\\_casos.htm](http://www.redbio.org/estud_casos.htm).
- Di Pauli, V., Fontana, P. D., e Rago, A. M. 2012. A palha de cana-de-açúcar como fonte de inóculo de *Acidovorax avenae*, agente causal da estria vermelha. XXXV Congresso Paulista de Fitopatologia. Summa Phytopathologica, v. 38 (supplement). 051.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C. W. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Dong, M., Yang, Z., Cheng, G., Peng, L., Xu, Q. and Xu, J. 2018 Diversity of the Bacterial Microbiome in the Roots of Four Saccharum Species: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, and *S. officinarum*. Front. Microbiol. 9:267. doi: 10.3389/fmicb.2018.00267.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. Bioinformatics 27, 2194–2200.
- Edgerton, C. W., 1959. Sugarcane and its Diseases. Louisiana State University Press, Baton Rouge, pp.172-174.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B. and Hamada, T. 2001. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5285–5293.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G. and Coppola, S. 2001. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural Whey Cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of “culture dependent” and “culture independent” approaches. Syst. Appl. Microbiol. 24:610–617.
- Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food: a review. J. Microbiol. Methods. 56:297–314.
- Fandos, C., Soria, F. J., Scandaliaris, P. y Carreras Baldrés, J. I. 2013. Análisis departamental del proceso de expansión del cultivo de caña de azúcar

en el área granera tucumana. Período febrero 2001-mayo 2013. En: Devani, R.; F. Ledesma y J. R. Sánchez (eds.), El cultivo de la soja en el Noroeste Argentino. Campaña 2012/2013. Publ. Espec. EEAOC 47: 203-208.

- Fawcett, G. L., 1922. Enfermedades de la Caña de Azúcar en Tucumán. Rev. Ind. Agric. Tucumán, 13 (1 -2): 5.
- Feil, E. J., Li, B. C., Aanensen, D. M., Hanage, W. P., and Spratt, B. G. 2004. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. J. Bacteriol. 186:1518-1530.
- Feil, E. J., E. C. Holmes, D. E. Bessen, M.-S. Chan, N. P. J. Day, M. C. Enright, R. Goldstein, D. W. Hood, A. Kalia, C. E. Moore, J. Zhou, and B. G. Spratt. 2001. Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:182-187.
- Feil, E. J., Maiden, M. C., Achtman, M. and Spratt, B.G. 1999. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*., Mol. Biolog. and Evol, 16:1496-1502.
- Feng, J., Schuenzel, E. L., Li, J., and Schaad, N. W. 2009. Multilocus sequence typing reveals two evolutionary lineages of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Phytopathology 99:913-920.
- Ferrari, C. y Macera, G. 2008. Azúcar: análisis de la cadena alimentaria. Dirección Nacional de Alimentos. Documento disponible en [http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r\\_33/cadenas/azucar\\_azucar.htm](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/revistas/r_33/cadenas/azucar_azucar.htm). Activo diciembre 2009.
- Fontana, C. A., Bassi, D., López, C., Pisacane, V., Otero, M.C., Puglisi, E., Rebecchi, A., Cocconcelli, P.S. and Vignolo, G. 2016. Microbial ecology involved in the ripening of naturally fermented llama meat sausages. A focus on lactobacilli diversity Int. J. Food Microbiol., 236:17-25
- Fontana, C. A., Cocconcelli P.S., and Vignolo G. 2005a. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. Inter. J. Food Microbiol. 103:131-142.
- Fontana, C. A., Cocconcelli P.S., and Vignolo G. 2005b. PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. Journal of Microbiological Methods 63:254- 263

- Fontana, C. A., Cappa F., Rebecchi A., and Cocconcelli P.S. 2010. Surface microbiota analysis of Taleggio, Gorgonzola, Casera, Scimudin and Formaggio di Fossa Italian cheeses. *Inter. J. Food Microbiol.* 138:205-211.
- Fontana, P. 2010. Estría Roja en caña de azúcar: caracterización y análisis molecular del agente etiológico. Tesis de Magister. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Argetina. 121pp.
- Fontana, P. D., Rago, A. M., Fontana, C. A., Vignolo, G. M., Cocconcelli, P. S., and Mariotti, J. A. 2013. Isolation and genetic characterization of *Acidovorax avenae* from red stripe infected sugarcane in Northwestern Argentina. *Eur. J. Plant Pathol.* 137:525-534.
- Fontana, P. D., Fontana, C. A., Bassi, D., Puglisi, E., Salazar, S. M., Vignolo, G. M., Coccocelli, P. S. 2016. Genome sequence of *Acidovorax avenae* strain T10\_61 associated with sugarcane red stripe in Argentina. *Genome Announc.* 4(1): e01669-15 doi:10.1128/genomeA.01669-15.
- Filloux, A., Hachani, A., and Bleves, S. 2008. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiol.* 154:1570–1583.
- Genti de Raimondi, S. 2013. Metagenómica: más allá del genoma de los microorganismos. *Bitácora Digital: Vol. 1, Núm. 2 (1).* Revista electronica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba.
- Gerlach, R.G., and Hensel, M. 2007. Protein secretion systems and adhesins: The molecular rmory of Gram-negative pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 297:401–415.
- Giglioti, E. A., and Matsuoka, S. 2000. False red stripe. In: Rott, P.; Bailey, R.A.; Comstock, J.C.; Croft, B.J. *A guide to sugarcane diseases.* Montpellier: Cirad Publications Service, pp.27-31.
- Giordano, P. R., Chaves, A. M., Mitkowski, N. A., and Vargas, J. M. 2012. Identification, Characterization, and Distribution of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* Associated with Creeping Bentgrass Etiolation and Decline. *Plant Dis.* 96:1736-1742.
- Giordano, P. R., Wang, J., Vargas, J., Jacobs, J. L., Chilvers, M. I., & Zeng, Q. Using a genome-based PCR primer prediction pipeline to develop molecular diagnostics for the turfgrass pathogen *Acidovorax avenae*. *Plant Dise..* doi:10.1094/pdis-01-18-0165-re

- Grisham, M. P., and Johnson, R. M. 2015. Assessing yield loss caused by smut and red stripe in sugarcane production fields. XI Pathology and XI Entomology Workshops pp32.
- Hamonts, K., Trivedi, P., Garg, A., Janitz, C., Grinyer, J., Holford, P., Botha, F., Anderson, I.C.C and Sinhg, B. 2018. Field study reveals core plant microbiota and relative importance of their drivers. *Environ. Microbiol.* 20(1), 124–140.
- Hayward, A. C., 1962. Studies on bacterial pathogens of sugar cane. Differentiation, taxonomy and nomenclature of the bacteria causing red stripe and mottled stripe diseases. *Mauritius Sugar Ind. Res. Inst., Oc-cas. Pap.*, 13:13 -27.
- Hébert, E. M., Raya, R. R., Tailliez, P., and Savoy, de Giori, G. 2000. Characterization of natural isolates of *Lactobacillus* strains to be used as starter cultures in dairy fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 59:19-27.
- Henson, J. M., and French, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *A. Rev. Phytopathology* 31:81-109.
- Holt, J. G. (ed.) 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD
- Hopkins, D. L. and Thompson, C. M. 2002. Evaluation of *Citrullus* sp. germplasm for resistance to *Acidovorax avenae* subsp *citrulli*. *Plant Dis.* 86:61-64.
- Hu, F. P., Young, J. M., and Trigg, C. M., 1991, Numerical analysis and determination tests for non-fluorescent plant-pathogenic *Pseudomonas* spp. and genomic analysis and reclassification of species related to *Pseudomonas avenae* Manns 1909. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:516-523.
- Huber, D. M., and Thompson, I. A. 2007. Nitrogen and Plant Disease. En: *Mineral Nutrition and Plant Disease*. Eds: Datnoff L., Elmer W., and Huber D. St.Paul, Minnesota, USA.
- Huey, B. and Hall, J., 1989. Hypervariable DNA fingerprinting *Escherichia coli*: minisatellite probe from bacteriophage M13. *J. Bacteriol.* 171, 2528–2532.
- Innerebner, G., Knief, C., and Vorholt, J. A. 2011. Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:3202–3210.

- Johnson, R. M., Grisham, M. P., Warnke, K. Z., and Maggio, J. R. 2016. Relationship of soil properties and sugarcane yields to red stripe in Louisiana. *Phytopathology* 106:737-744.
- Johnson, R. M., Grisham, M. P., and Richard, E. P., Jr. 2007. Relationship between sugarcane rust severity and soil properties in Louisiana. *Phytopathology* 97:748-755.
- Jones, J. B., Gitaitis, R., and Schaad, N. 2001. *Acidovorax* and *Xylophilus*. En: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Eds. Schaad N., Jones J.B. and Chun W. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN. pp.121-137.
- Khalil, F., Yueyu, X., Naiyan, X., Di, L., Tayyab, M., Hengbo, W., Islam, W., Rauf., S, Pinghua, C. 2018. Genome characterization of Sugarcane Yellow Leaf Virus with special reference to RNAi based molecular breeding. *Microb. Pathog.* 120:187-197.
- Klijn, N., Weerkamp, H., and de Vos, W. 1991. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable region of 16S rRNA and specific DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3390-3393.
- Lane, D. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques*. En: *Bacterial Systematic*. Eds. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom. pp. 115-175.
- Lee, H. A., Purdy, H.A., Barnum, C.C., and Martin, J.P., 1925. A comparison of red-stripe disease with bacterial diseases of sugar cane and other grasses. *Red-Stripe Disease Studies*. Hawaii. Sugar Plant. Assoc. Exp. Stn, Pathol. Dept., pp.64-74.
- Li, B., Wang, X., Chen, J., Liu, H., Ali, K. A., Wang et al. 2018. IcmF and DotU are required for the virulence of *Acidovorax oryzae* strain RS-1. *Archv.of Microbiol.* 200(6):897-910.
- Li, X. Y., Sun, H. D., Rott, P. C., Wang, J. D., Huang, M. T., Zhang, Q.Q., and Gao, S. J. 2017. Molecular identification and prevalence of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* causing red stripe of sugarcane in China. *Plant Pathol.* 67(4):929-937.
- Li, R., Mock, R., Huang, Q., Abad, J., Hartung, J., and Kinard, G. 2008. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens. *J. Virol. Methods* 154:48-55.

- Lin, S. Y., Hameed, A., Shen, F. T., Liu, Y. C., Hsu, Y. H., Shahina, M. 2014. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazon.* *Antonie Van Leeuwenhoek* 105, 1149-1162.
- Long, S. R. 1989. Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* 56:203-214.
- Lopes, L. D., Pereira e Silva, M. D. C., and Andreote, F. D. 2016. Bacterial abilities and adaptation toward the rhizosphere colonization. *Front. Microbiol.* 7:1341. doi: 10.3389/fmicb.2016.01341.
- Love, M. L, Huber, W., and Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for rna-seq data with *deseq2*. *Genome Biol*, 2014; 15:550
- Lyon, H. L., 1922. A leaf disease of the Tip canes. *Proc. Hawaii. Sugar Plant. Assoc.* p.246.
- Maccheroni, W., y Matsuoka, S. 2006. Manejo das principais doenças da cana-de-açúcar. En: *Atualização em produção de Cana-de-açúcar*. Eds. Segato S., Pinto A. de Sene., Jendiroba E., y Nóbrega J.C.M. de. Piracicaba, Brasil. pp.239-280.
- Maiden, M. C. 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu.Rev. Microbiol.* 60:561-588.
- Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G., 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3140-3145.
- Manns, T. F. 1909. The blade blight of oats-a bacterial disease. *Ohio Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* 210:91-167.
- Mannulis, S., Valinsky, A., Lichter, A., and Gabriel, D. W. 1994. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas campestris* pv *pelargonii* with DNA primers and probes identified by random amplified polymorphic DNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:4094-4099.
- Mariotti. J. A. 2008. Investigación e Innovación Tecnológica como bases para mejorar la productividad y competitividad de la Agroindustria de la Caña de Azúcar. En: *Idia XXI Cultivos Industriales*. Ed. Senigagliaesi

C., Arnozis P., y Mariotti J. Año VII-Nº10. Publicaciones nacionales INTA. Bs.As. Argentina. pp.119-122.

Martin, J. P., and Wismer C.A., 1989, Red Stripe. En: Diseases of Sugarcane. Eds. C. Ricaud, B.T. Egan, A.G. Gillespie, Jr., and C.G. Hughes. Elsevier, The New York, N.Y. pp. 80-91.

Masella, A., Bartram, A., Truszkowski, J., Brown, D., Neufeld, J., 2012. PANDAseq: pairedend assembler for illumina sequences. BMC Bioinf. 13, 31.

McNeil, M. D., Bhuiyan, S.A., Berkman, P.J., Croft, B.J., Aitken, K.S. 2018. Analysis of the resistance mechanisms in sugarcane during *Sporisorium scitamineum* infection using RNA-seq and microscopy. PLoS ONE 13(5):e0197840.

Moradi, Z., Nazifi, E., Mehrvar, M. 2017. Molecular characterization of two sugarcane streak mosaic virus isolates from Iran with emphasis on its population structure. Acta Virol. 61(4):428-437.

Moxon, E. R., Rainey, P. B., Nowak, M. A., and Lenski, R. E.1994. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. Current Biology, 4(1):24-33.

Mozambani, A., Pinto, A., Segato, S., y Mattiuz, F. M. 2006. Historia e morfologia da cana-de-açúcar. En: Atualização em produção de Cana-de-açúcar. Eds. Segato S., Pinto A. de Sene., Jendiroba E., y Nóbrega J.C.M. de. Piracicaba, Brasil. pp.11-18.

Mumford, R., Boonham, N., Tomlinson, J., and Barker, J. 2006. Advances in molecular phytodiagnostics-new solutions for old problems. Eur. J. Plant Pathol. 116:1-19.

Nóbrega, J. C. M. de., y Dornela, M. C. 2006. Biotecnología e melhoramento da cana-de-açúcar. En: Atualização em produção de Cana-de-açúcar. Eds. Segato S., Pinto A. de Sene., Jendiroba E., y Nóbrega J.C.M. de. Piracicaba, Brasil. pp.39-56.

Noller, A. C., McEllistrem, M. C., Stine, O. C., Morris, J. M., Jr., Booxrud, D. J., Dixon, B., and Harrison, L. H. 2003. Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulse-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 41:675-679.

Odds, F. C. and M. D. Jacobsen (2008). "Multilocus sequence typing of pathogenic *Candida* species. Eukaryotic cell 7(7): 1075-1084.

- Olembo, R. 1991. Importance of microorganisms and invertebrates as components of biodiversity. pp. 7-15. In: D.L. Hawksworth (ed.). The biodiversity of microorganisms and invertebrates: Its role in sustainable agriculture. Redwood Press, Melksham, UK.
- Paungfoo-Lonhienne, C., Lonhienne, T.G., Yeoh, Y.K., Donose, B.C., Webb, R.I., Parsons, J. 2016. Crosstalk between sugarcane and a plant-growth promoting Burkholderia species. *Sci Rep* 6(1). DOI: 10.1038/srep37389
- Perera, M. F., Filippone, M. P., Ramallo, C. J., Cuenya, M. I., García, M. L., Ploper, L. D., and Castagnaro, A. P. 2009. Genetic diversity among viruses associated with sugarcane mosaic disease in Tucumán, Argentina. *Phytopathology* 99:38-49.
- Pérez D.; Fandos, C.; Scandaliaris, J.; Mazzone, L.; Soria, F.; Scandaliaris, P. 2007. Estado actual y evolución de la productividad del cultivo de caña de azúcar en Tucumán y el noroeste argentino en el período 1990-2007. Informe Especial EEAOC 34 24pp.
- Pérez Gómez, S., Vallejo, J., Fontana, P., y Rago, A. 2010. Evaluación de estría roja en los cañaverales de Tucumán. Resumen presentado en: XVI Reunión Técnica Nacional de la Caña de Azúcar. Tucumán, Argentina.
- Peixoto-Junior, R. F., Creste, S., Landell, M. G., Nunes, D. S., Sanguino, A., Campos, M. F., Vencovsky, R., Tambarussi, E. V., Figueira, A. 2014. Genetic diversity among *Puccinia melanocephala* isolates from Brazil assessed using simple sequence repeat markers. *Genet Mol Res.* 13(3):7852-7863.
- Pořka, J., Rebecchi, A., Pisacane, V., Morelli, L., Puglisi, E., 2015. Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high throughput sequencing of 16S rRNA amplicons. *Food Microbiol.* 46, 342–356.
- Pooler, M., Ritchie D., and Hartung J. 1996. Genetic and relationships among strains of *Xanthomonas fragariae* based on random amplified polymorphic DNA PCR, repetitive extragenic palindromic PCR and Enterobacterial repetitive intergenica consensus PCR primers useful for the identification of this phytopathogen. *Appl. and Environ. Microbiol.* 62(9):3121-3127.
- Proença, D. N., Schwab, S., Baldani, J. I., and Morais, P. V. 2017. Diversity and function of endophytic microbial community of plants with economical potential. En *Diversity and Benefits of Microorganisms*

from the Tropics. Eds de Azevedo, J. L. and Quecine, M. C. (Cham: Springer International Publishing), pp.209-243.

- Pulawska, J., Mikicinski, A., and Orlikowski, L. 2013. *Acidovorax cattleyae*-the causal agent of bacterial brown spot of *Phalaenopsis lueddemanniana* in Poland. J. Plant Pathol. 95:407-410.
- Rachid, C. T., Pires, C. A., Leite, D. C., Coutinho, H. L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Salton, J., Zanatta, J. A., Mercante, F. M., Angelini, G. A. and Balieiro, F. C. 2016. Sugarcane trash levels in soil affects the fungi but not bacteria in a short-term field experiment. Braz J Microbiol. 47(2):322-326.
- Rachid, C. T., Piccolo, M. C., Leite, D. C., Balieiro, F. C., Coutinho, H. L., van Elsas, J. D., Peixoto, R. S., and Rosado, A. S. 2012. Physical-chemical and microbiological changes in Cerrado Soil under differing sugarcane harvest management systems. BMC Microbiol. 12(1):170.
- Rago, A. 2005. Estado Sanitario del cañaveral en Tucumán, Salta y Jujuy. Delimitación de áreas de riesgo. Libro de Resúmenes XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología pp.133-135.
- Rago, A. M. 2003. Caña de Azúcar. Guía de las enfermedades más comunes en Argentina. Ed. Mariotti J. y Fernández de Ullivarri R. Publicaciones INTA, Córdoba, Argentina.
- Rago, A., Pérez Gómez, S., Felipe, A., Fontana, P y Terán, C. 2008. Reacción a estría roja de las variedades comerciales de caña de azúcar en Tucumán. 1º Congreso Argentino de Fitopatología. Asociación Argentina de Fitopatología. 28 - 30 de mayo de 2008. p. 329.
- Ramallo, N. E. V. 1970. La estría roja en caña de azúcar. Revista industrial y agrícola de Tucumán 47(1):13-16.
- Reis, V. M., Estrada-de los Santos, P., Tenorio-Salgado, S., Vogel, J., Stoffels, M., Guyon, S. 2004. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogenfixing, plant-associated bacterium. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54(6):2155-2162.
- Rios, L. 2008. Mercado Mundial de Azúcar. Visión Global. En: Idia XXI Cultivos Industriales. Eds. Senigaliesi C., Arnozis P., y Mariotti J. Año VII-Nº10. Publicaciones nacionales INTA. Bs.As. Argentina. pp.129-134.
- Rios, L., y Delgado Cordomi, M. 2008. Cadena de valor de la caña de azúcar. En: Economía de los cultivos industriales: algodón, caña de azúcar, maní,

tabaco, té y yerba mate. Ed. Bongiovanni R., Córdoba, Argentina. pp.25-32.

Rodriguez Santiago, B. y Armengol, L. 2012. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagnost. Prenat.* 23(2):56-66.

Romero, E., Scandaliaris, J., Digonzelli, P., Leggio Neme, M. F., Fernandez de Ullivarri, J., Casen, S., Tonatto, J., y Alonso, L. 2009. La Caña de Azúcar. Características y ecofisiología. En: Manual del cañero. Ed: Romero E., Dogonzelli P., y Scandaliaris J. Tucumán, Argentina. pp.13-21.

Rott, P., and Davis, M. J. 2000. Red Stripe (Top rot). En: A guide to sugarcane diseases. Montpellier: Cirad Publications Service, pp.60-62.

Sanzano, A., y Fadda, G. 2009. Características de los suelos para caña de azúcar. Recomendaciones de manejo. En: Manual del cañero. Ed: Romero E., Dogonzelli P., y Scandaliaris J. Tucumán, Argentina. pp. 23-34.

Savulescu, T. 1947, Contribution a la classification des bacteriacees phytopathogenes. *An. Acad. Romane Ser. III* 22:135-160.

Schaad, N. W., Sowell Jr., G., Goth, R. W., Colwell, R. R., and Webb, R. E. 1978, *Pseudomonas pseudoalcaligenes subsp. citrulli* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 28:117-125.

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

Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3ª edición. St. Paul, Minnesota, EEUU. pp.373.

Schaad, N. W. and Frederick, R. D. 2002. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Can. J. Plant Pathol.* 24:250-258.

Schaad, N. W., Postnikova, E., Sechler, A., Clafin, L., Vidaver, A., Jones, J. B., Agarkova, I., Ignatov, A., Dickstein, E., and Ramundo, B. 2008. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. Avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb.nov., *A. citrulli* (Schaad et al., 1978) comb.nov., and proposal of *A. oryzae* sp.nov. *Syst. And Appl Microb.* 31:434-446.

- Schloss, P., Westcott, S., Ryabin, T., Hall, J., Hartmann, M., Hollister, E., Lesniewski, R., Oakley, B., Parks, D., Robinson, C., et al., 2009. Introducing mothur: open-source, platformin dependent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537-7541.
- Sharma, R., and Tamta. S. 2017. Red rot resistant gene characterization using RGAP markers among sugarcane cultivars resistant and susceptible to the red rot disease. *Biotech.* 7(5):306.
- Silva, G. M., Souza, R. M., Yan, L., J´unior, R. S., Medeiros, F. H. V., and Walcott, R. R. 2016. Strains of the group I lineage of *Acidovorax citrulli*, the causal agent of bacterial fruit blotch of cucurbitaceous crops, are predominant in Brazil. *Phytopathology* 106:1486-1494.
- Song, W. Y., Kang, M. H., and Kim, H. M. 2000. A New Selective Medium for Detecting *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* in Rice Seeds. *Plant Pathology Journal* 16(4):236-241.
- Song, W. Y., Sechler, A. J., Hatziloukas, E., Kim, H. M., and Schaad, N. W. 2003. Use of PCR for rapid identification of *Acidovorax avenae* and *A. avenae* subsp. *citrulli*. En: N.S. Iacobellis, et al. (Eds.), *Pseudomonas syringae* and related pathogens. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.531-544.
- Song, W. Y., Kim, H. M., Hwang, C. Y., and Schaad, N. W. 2004. Detection of *Acidovorax avenae* ssp. *avenae* in rice seeds using BIO-PCR, *J. Phytopathol.* 152:667-676.
- Souza, R. S. C., Okura, V. K., Armanhi, J. S. L., Jorrin, B., Lozano, N., da Silva, M. J. et al. 2016. Unlocking the bacterial and fungal community assemblages of sugarcane microbiome. *Sci. Rep.* 6, 28774; doi: 10.1038/srep28774.
- Spegazzini, C. 1895. La gangrena húmeda o polvillo en la caña de azúcar en Tucumán. *Rev. Fac. Agronomía. La Plata.* N°18.
- Stead, D. E. 1995. Profiling techniques for the identification and classification of plant pathogenic bacteria. *EPPO Bulletin*, 25:143-150.
- Tam, V.C., Serruto, D., Dziejman, M., Briehner, W., Mekalanos, J.J. 2007. A type III secretion system in Vibrid cholerae translocates a Formin/Spire hybrid-like actin nucleator to promote intestinal colonization. *Cell Host Microbe.* 1:95-107.

- Timilsina, S., Jibrin, M. O., Potnis, N., Minsavage, G. V., Kebede, M., Schwartz, A., Bart, R., Staskawicz, B., Boyer, C., Vallad, G.E, Pruvost, O., Jones, J. B., Goss, E. M. 2015. Multilocus sequence analysis of *Xanthomonas* causing bacterial spot of tomato and pepper plants reveals strains generated by recombination among species and recent global spread of *Xanthomonas gardneri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(4):1520–1529.
- Tomasini, N., Lauthier, J. J., Llewellyn, M. S., and Diosque P. 2013 MLSTest: Novel software for multi-locus sequence data analysis in eukaryotic organisms. *Infection, Gen. and Evol.* 20:188–196.
- Tomasini, N., Lauthier, J. J., Ayala, F. J., Tibayrenc, M., and Diosque, P. 2014 How Often Do They Have Sex? A Comparative Analysis of the Population Structure of Seven Eukaryotic Microbial Pathogens. *PLoS ONE* 9(7): e103131.
- Urwin, R., and Maiden, M. C. 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiol.* 11(10):479-487.
- USDA *United States Department of Agriculture*. Sugar: World Production Supply and Distribution. Foreign Agricultural Service USDA, 2018. Disponible en: <http://www.fas.usda.gov>. Activo mayo 2018.
- Volante, J., Benedetti, P., Paoli, H., Moreno, R., y Fernandez, D. 2004. Monitoreo de Cultivos del Noroeste Argentino a partir de Sensores Remotos. Campaña Agrícola 2004-Caña de Azúcar. Disponible-en: [http://www.inta.gov.ar/prorenea/zonadescarga/Cana04/INFORME\\_FINAL\\_CA%C3%91A2004.pdf](http://www.inta.gov.ar/prorenea/zonadescarga/Cana04/INFORME_FINAL_CA%C3%91A2004.pdf).
- Vasileiadis, S., Puglisi, E., Trevisan, M., Scheckel, K. G., Langdon, K., McLaughlin, M., Lombi, E., Donner, E. 2015. Changes in soil bacterial communities and diversity in response to long-term silver exposure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91(10):fiv114.
- Wallberg, J., y Minetti, J. 2015: Caña de azúcar: símbolo de identidad cultural y desarrollo local. Disponible en: <http://intainforma.inta.gov.ar/?%20p=17968>. Activo febrero 2016.
- Walcott, R. R., Langston, D. B., Sanders, F. H., and Gitaitis, R. D. 2000. Investigating intraspecific variation of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* using DNA fingerprinting and whole cell fatty acid analysis. *Phytopathology* 90:191-196.
- Walcott, R. R. Fessehaie, A. and Castro, A. C. 2004. Differences in Pathogenicity between two Genetically Distinct Groups of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* on Cucurbit Hosts. *J. Phytopathol.* 152:277–285.

- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G., Lis C., Munro, K. and Hammes ,W. 2001 Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2578–2585.
- Wechter, W. P., Levi, A., Ling, K. S., Kousik, C. S., and Block, C.C. 2011. Identification of resistance to *Acidovorax avenae* subsp *citrulli* among melon (*Cucumis* spp) plant introductions. *HortScience* 46:207-212.
- Willems, A, and Gillis, M. 2015. *Acidovorax*. In: Whitman WB, ed. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. pp.1–16.
- Willems, A., Goor M., Thielemans S., Gillis M., Kersters K., and De Ley J. 1992, Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*, and *Acidovorax konjaci*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:107-119.
- Yan, L., Hu, B., Chen, G., Zhao, M., and Walcott, R. 2017. Further Evidence of Cucurbit Host Specificity among *Acidovorax citrulli* Groups Based on a Detached Melon Fruit Pathogenicity Assay. *Phytopathology* 107(11): 1305-1311.
- Yan, S., Yang, Y., Wang, T., Zhao, T., and Schaad, N. W. 2013 Genetic diversity analysis of *Acidovorax citrulli* in China. *Eur J Plant Pathol.* 136:171–181.
- Yeoh, Y. K., Paungfoo-Lonhienne, C., Dennis, P. G., Robinson, N., Ragan, M. A., Schmidt, S., and Hugenholtz, P. 2016 The core root microbiome of sugarcane cultivated under varying nitrogen fertilizer application. *Environ Microbiol* 18: 1338–1351.
- Zhang, H., Sun, Y., Xie, X., Kim, M. S., Dowd, S. E., and Pare, P. W. 2009. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. *Plant J.* 58:568–577.
- Zeng, Q., Wang, J., Bertels, F., Giordano, P., Chilvers, M., Huntley, R., Vargas, J., Sundin, G., Jacobs, J., and Yang, C. H. 2017. Recombination of Virulence Genes in Divergent *Acidovorax avenae* Strains That Infect a Common Host. *Mol Plant Microbe Interact* 30(10):813–828

## Proyecciones

- Ampliar el análisis MLST y explorar la presencia de *Acidovorax avenae* en las áreas de frontera donde se cultiva caña de azúcar, sobre todo Bolivia y Paraguay donde hay acciones previas con otras enfermedades en el marco de la RED de ensayos INTA.
- Profundizar el análisis del genoma de *Acidovorax avenae*, con énfasis en estudios genómicos funcionales y filogenéticos.
- Ampliar el estudio de la microbiota en el patosistema *Acidovorax*-caña de azúcar incluyendo en el análisis metagenómico partes aéreas, hojas principalmente, y en una etapa posterior tallo y partes subterráneas como raíces y rizomas.

## Lista de Tablas

Tabla 2.1	Detalle de las localidades donde se realizó la recolección y las variedades muestreadas.	30
Tabla 2.2	Medios de cultivos generales y semiselectivos para el aislamiento de <i>Acidovorax avenae</i> .	33
Tabla 2.3	Cebadores usados para la identificación de <i>Acidovorax avenae</i> .	37
Tabla 2.4	Combinaciones de cebadores y ciclos de amplificación.	37
Tabla 2.5	Componentes y concentraciones de las mezclas de PCR.	39
Tabla 2.6	Cebadores y ciclos de amplificación para las reacciones de RAPD.	41
Tabla 2.7	Componentes de reacción para MLST.	42
Tabla 2.8	Secuencias de cebadores para los siete genes amplificados MLST.	43
Tabla 2.9	Cepas analizadas mediante MLST.	44
Tabla 2.10	Genomas de <i>Acidovorax</i> sp. analizados.	50
Tabla 2.11	Escala de valor para evaluación de síntomas de estría roja, causados por <i>Acidovorax avenae</i> .	52
Tabla 2.12	Muestras analizadas en los métodos independientes de cultivo.	56
Tabla 2.13	Cebadores evaluados en los experimentos de DGGE.	60
Tabla 2.14	Combinaciones de cebadores y productos de amplificación.	61
Tabla 2.15	Indexed Primers (barcodes) usados en el estudio.	62

Tabla 3.1	Aislamientos obtenidos según localidad y variedad a partir de hojas sintomáticas de caña de azúcar.	67
Tabla 3.2	Perfiles alélicos obtenidos en este estudio mediante análisis MLST.	74
Tabla 3.3	Valores de severidad promedio obtenidos para cada tratamiento en los ensayos de virulencia	89
Tabla 3.4	Bandas analizadas a partir de los geles DGGE.	94
Tabla 3.5	Número de secuencias analizadas, cobertura de muestra estimada para el amplicón de ARNr 16S, riqueza Chao 1 e índices de diversidad Shannon y Simpson.	96
Tabla 3.6	Resumen de resultados de diversidad alfa. Rojo = genotipos tolerantes; Amarillo = genotipos susceptibles. En recuadros se remarcan las muestras para ambos genotipos en condiciones de monocultivo con marcada disminución de OTUs.	105
Tabla 3.7	Valores de diversidad alfa. Rojo = genotipos tolerantes; Amarillo = genotipos susceptibles. S85 y S84 condiciones de monocultivo para genotipo tolerante y susceptible respectivamente, con marcada disminución de OTUs.	111

### Lista de Figuras

Figura 1.1	Esquema del proceso típico de fabricación de azúcar y alcohol.	6
Figura 1.2	Áreas productoras de caña de azúcar en Argentina y distribución de ensayos de variedades de INTA (A), Superficie plantada con caña de azúcar en la provincia de Tucumán (2018) (B).	7
Figura 1.3	Distribución porcentual de la superficie ocupada por las variedades cultivadas en la provincia de Tucumán según relevamiento campaña 2016/2017.	8
Figura 2.1	Planta joven de caña de azúcar exhibiendo un ataque severo de estría roja (A); Detalle lesión típica en hoja (B).	30
Figura 2.2	Inoculaciones en plantines jóvenes de caña de azúcar (A, B) Plantines en cámara húmeda (C); plantines en sombráculo después de 72hs de inoculación (D).	53
Figura 3.1	Colonias de <i>A. avenae</i> obtenidas sobre placas de Petri en medios de cultivo: Agar nutritivo-AN y Extracto de levadura-dextrosa-carbonato de calcio-YDC (A). Colonias obtenidas sobre placas de Petri como resultado de los aislamientos directos en medio de cultivo Agar nutritivo-AN (B).	66
Figura 3.2	Electroforesis en gel de agarosa (1,2%). PCR especie-específica donde se observa el fragmento de 550 pb amplificado con los cebadores <i>oaf1/oar1</i> . Los números sobre las calles corresponden a diferentes aislamientos de <i>A. avenae</i> : Santa Fe (2, 3, 5, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 31); Misiones (6, 17, 18, 22, 23, 30) y Salta (1, 4, 10, 19); 9 y 28: Marcador de peso molecular de 100 pb. Columnas sin señal corresponden a aislamientos PCR negativo (4, 10, 18) y control negativo (34). Fig.3.3A.	72
Figura 3.3A	Perfiles RAPD M13 de cepas de <i>A. avenae</i> de Salta, Santa Fe, Misiones y Tucumán. Electroforesis en gel de agarosa al 3%. Calles 1; 24; 25 y 48: Marcador 100bp; calles 35 a 38: blancos (o controles negativos)	71
Figura 3.3B	Dendrograma construido empleando el Programa Bio Numerics, con el cebador RAPD M13 para los aislamientos de <i>Acidovorax</i> analizados. La matriz de	72

similitud fue calculada utilizando el coeficiente de similitud de Dice mientras que el dendrograma fue construido por el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

Figura 3.4	Análisis BURST de cepas de <i>A. avenae</i> de caña de azúcar y otras <i>Acidovorax</i> mostrando los complejos clonales.	78
Figura 3.5	Árbol de Neighbor Joining donde se grafican los perfiles alélicos, y los complejos clonales.	79
Figura 3.6	Gráficos de BURST, complejos clonales: el tamaño del círculo indica el número de cepas que contiene un ST.	80
Figura 3.7	Árbol de Neighbor Joining para el gen <i>gltA</i> . Agrupamiento de cepas de <i>A. avenae</i> de caña de azúcar (círculo), y las cepas de referencia de <i>A. citrulli</i> , <i>A. oryzae</i> y otras <i>A. avenae</i> subsp <i>avenae</i> .	80
Figura 3.8-3.9	Árbol de Neighbor Joining para el gen <i>gmc</i> (1) y <i>lepA</i> (2), respectivamente.	81
Figura 3.10-3.11	Árbol de Neighbor Joining para el gen <i>phaC</i> (1) y <i>pilT</i> (2), respectivamente.	81
Figura 3.12-3.13	Árbol de Neighbor Joining para el gen <i>trpB</i> (1) y <i>ugpB</i> (2), respectivamente.	82
Figura 3.14	Árbol de Neighbor-joining (N-J) del análisis de cepas de <i>Acidovorax</i> basado en la distancia p de las secuencias concatenadas de los siete <i>loci</i> . Valor Bootstrap (1000 replicaciones) se muestran para cada rama.	82
Figura 3.15	Incongruencia topológica basada en <i>loci</i> concatenados. Los números sobre las ramas indican el número de árboles de locus individuales que son incompatibles con dicha rama. Las ramas coloreadas indican que la incongruencia topológica es estadísticamente significativa con $p < 0.01$ (naranja) y $p < 0.001$ (rojo) según la prueba de Templeton.	83
Figura 3.16	Diagrama de escala multidimensional de las cepas de <i>Acidovorax</i> basado en las secuencias concatenadas. Los dos ejes explican una variabilidad $>90\%$ .	83

Figura 3.17	Red de consenso de los siete <i>loci</i> que muestra posible intercambio genético. Cada división en la red se muestra si al menos dos árboles tenían esa división. Las regiones de red con patrones cuadrados indican recombinación probable.	84
Figura 3.18	Gráfico de distribución y número de genes en los diferentes subsistemas presentes en <i>A. avenae</i> T10_61.	85
Figura 3.19	Distribución de genes “Core vs Accessory” para las cepas analizadas (A), selección solo de los genes que formar parte del “core genoma” (B) y visualización de los genes “Accessory” (C).	86
Figura 3.20	Ilustra la selección de genes únicos presentes en una de las cepas del grupo analizado.	87
Figura 3.21	Árbol filogenético obtenido del análisis de los SNPs de los genes del “core genome”. Se observan 2 clusters principales, en la parte superior se agrupan las <i>A. avenae</i> , aunque bien separadas de acuerdo al huésped y fuera de ese grupo se ubica la cepa de <i>A. cattleyae</i> . En el <i>cluster</i> inferior se agrupan todas las cepas de <i>A. citrulli</i> y también se distinguen las cepas según el huésped.	88
Figura 3.22	Síntomas de estría roja desarrollados en plantines de caña de azúcar a partir de inoculaciones artificiales. De acuerdo con la escala de calificación 0 a 4: 0 = sin síntomas (a), 1 = infección localizada y menos de tres estrías rojas por hojas (b), 2 = infección avanzada y más de tres estrías por hojas (c), 3 = infección severa con estrías que alcanzan el brote apical (d), 4 = podredumbre apical y/o muerte del brote guía (e).	90
Figura 3.23	Fragmento del gel de una electroforesis de DGGE de muestras de suelo (A) y de hojas (B) donde se observan algunas de las bandas más intensas seleccionadas para secuenciar.	92
Figura 3.24	DGGE de ADN total de hojas con un ADN de cultivo puro de <i>A. avenae</i> . Sólo en la muestra GS1b se observa una banda con migración similar a la banda de <i>Acidovorax</i> .	93

Figura 3.25	Curvas de rarefacción donde se muestran secuencias totales por muestra (A); Índice de Chao1 (B); Simpson (C); Shannon (D).	97
Figura 3.26	Clases más abundantes observadas en el GS (A) y en el GT (B).	98
Figura 3.27	Orden y familia dominantes: para ambos genotipos tolerante (GT) y Susceptible (GS) en todos los muestreos (ddc).	100
Figura 3.28	Gráfico de ordenes dominantes en el genotipo tolerante(A) y susceptible (B) en muestra de 180 días desde cosecha, contrastado con un control caña-caña.	101
Figura 3.29	Heatmap con los géneros más abundantes para ambos genotipos GS(A) y GT (B) en todos los tiempos de muestreo caña-soja y control único caña-caña (GSUG y GTUG).	103
Figura 3.30	Curvas de rarefacción donde se observa el número de secuencias por muestra y número de OTUs.	104
Figura 3.31	Bar Plot donde se muestra la abundancia de <i>Phylum</i> de las distintas muestras.	105
Figura 3.32	Análisis de <i>cluster</i> de las muestras utilizando el índice de Bray Curtis y el algoritmo UPMGA. A. Por época de muestreo expresada en días desde cosecha (ddc) B. Por año según ciclo de cultivo, expresado en año calendario (2013, 2014 y 2015) y C: según la condición del genotipo (tolerante y susceptible).	107
Figura 3.33	Análisis de coordenadas principales (PCoA). A: Por época de muestreo expresada en días desde cosecha (ddc) B: Por año según ciclo de cultivo, expresado en año calendario (2013, 2014 y 2015) y C: según la condición del genotipo (tolerante y susceptible).	109
Figura 3.34	Análisis de coordenadas principales (PCoA) según un sistema de manejo con y sin rotación con soja.	110
Figura 3.35	Bar Plot donde se muestra la abundancia de <i>Phylum</i> de las distintas muestras con y sin rotación en 180ddc.	111

## Publicaciones

-2018 **Fontana P. D.**, Tomasini N., Fontana C.A., Di Pauli V., Cocconcelli P., Vignolo G., and Salazar S. MLST reveals a separate and novel clonal group for *Acidovorax avenae* strains causing red stripe in sugarcane from Argentina.

*Phytopathology* <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0303-R>

-2016 **Fontana P. D.**, Fontana C. A., Bassi D., Puglisi E., Salazar S., Vignolo G. and Cocconcelli P. Genome Sequence of *Acidovorax avenae* Strain T10\_61 Associated with Sugarcane Red Stripe in Argentina. *Genome Announc* 4(1):e01669-15 doi:10.1128/genomeA.01669-15.

## Presentaciones Congresos/Reuniones científicas

-2018 Exploring genetic diversity of *Acidovorax avenae* strains associated with sugarcane red stripe by MLST analysis. **Fontana P. D.**, Tomasini N., Fontana C.A., Di Pauli V., Cocconcelli P., Vignolo G., and Salazar ISSCT XXX Congress. Tucumán Argentina. Aceptado *full paper*.

-2018 Soil microbial community responses to differential sugarcane management strategies as revealed by 16S metagenomics. **Fontana P. D.**, Orru' L., Fontana C.A., Cocconcelli P., Vignolo G., and Salazar. ISSCT XXX Congress. Tucumán Argentina. Aceptado *full paper*

-2018 Secuenciación de alto rendimiento del gen 16S ribosomal para el estudio de la microbiota presente en suelo rizosférico de Caña de Azúcar en un sistema de cultivo de rotación con Soja. **Fontana, P.D.**, Fontana, C.A., Cocconcelli, P.S., Vignolo, G.M., Salazar, S.M. IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Mar del Plata. Argentina.

-2017 Detección y caracterización genética de *Acidovorax avenae* en el área cañera del noreste argentino. **Fontana P.D.**, Di Pauli V., Fontana C.A., Pérez Gómez S., Salazar S. 4to Congreso Argentino de Fitopatología. Mendoza. Argentina.

-2015 Proyecto genoma de *Acidovorax avenae* cepa T10\_61, agente causal de estría roja en caña de azúcar. **Fontana P.D** Fontana C.A Cocconcelli P.S. Vignolo G.M Salazar S.M. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires. Argentina.

## Lista de abreviaturas y/o símbolos

°C	Temperatura en grados centígrados
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
m	Metro
cm	centímetros
csp	cantidad suficiente para
dNTPs	desoxinucleósidos trifosfato
ha	hectárea
g	gramos
h	horas
kg	Kilogramos
L	Litro
mM	miliMolar
min	minutos
seg	segundos
ml	mililitro
mm	milímetro
ITS	Región espaciadora 16S-23S
o.n.	over night
MERCOSUR	Mercado Común del Sur

<b>NOA</b>	Noroeste Argentino
<b>NEA</b>	Noreste Argentino
<b>PBI</b>	Producto Bruto Interno
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>RAPD</b>	Random Amplified Polymorphic DNA
<b>MLST</b>	Multilocus Sequence Typing
<b>ST</b>	Sequence Type
<b>DGGE</b>	Dennaturing Gradiente Gel Electrophoresis
<b>OTU</b>	Unidad Taxonómica Operativa
<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing
<b>HTS</b>	High Throughput Sequencing
<b>RDP</b>	Ribosomal Data Projeet
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
<b>REP-PCR</b>	Repetitive sequence based polymerase chain reaction
<b>USDA</b>	United States Department of Agriculture
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization
<b>INTA</b>	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
<b>T<sub>A</sub></b>	Temperatura de annealing
<b>Taq polimerasa</b>	<i>Thermus aquaticus</i> ADN polimerasa
<b>pb</b>	pares de bases
<b>hab</b>	habitante
<b>T<sub>m</sub></b>	Melting Temperature
<b>tn</b>	toneladas
<b>UFC/ml</b>	Unidades Formadoras de Colonias por mililitro

$\mu\text{g}$	microgramo
$\mu\text{L}$	microlito
$\mu\text{m}$	micrómetros
$\mu\text{M}$	micromolar

**Anexo I: Proteínas de los sistemas de secreción presentes en genomas de *Acidovorax* analizados.**

Nombre de las Proteínas	Longitud (aa)	<i>A. avenae</i>			<i>A. citrulli</i>						<i>A. cattleyae</i>	<i>A. oryzae</i>
		RS-1	ATCC19860	T10_61	KACC17005	AAC00-1	tw6	psb65	M6	DSMZ17060	DSMZ17101	ATCC19882
Flagellar type III secretion system protein FlhB	1092											
Flagellar type III secretion system protein FliQ	267											
general secretion pathway protein GspL	1251											
EscJ/YscJ/HrcJ family type III secretion inner membrane ring protein	859											
EscC/YscC/HrcC family type III secretion system outer membrane ring protein	2052											
EscV/YscV/HrcV family type III secretion system export apparatus protein	2064											
EscR/YscR/HrcR family type III secretion system export apparatus protein	663											
EscS/YscS/HrcS family type III secretion system export apparatus protein	264											
EscU/YscU/HrcU family type III secretion system export apparatus switch protein	1059											
flagellar type III secretion system protein FlhB	1173											
HlyD family type I secretion periplasmic adaptor subunit	894											
HrpE/YscL family type III secretion apparatus protein	835											
secretion protein EspV	1267											
Type II secretion system F family protein	1071											
Type II secretion system F family protein	1283											
Type II secretion system protein	762											
Type II secretion system protein	1086											
Type II secretion system protein	723											
Type II secretion system protein E	1233											
Type II secretion system protein E	1722											

## Cont. Anexo I

Nombre de las Proteínas	Longitud (aa)	<i>A. avenae</i>			<i>A. citrulli</i>						<i>A. cattleyae</i>	<i>A. oryzae</i>
		RS-1	ATCC19860	T10_61	KACC17005	AAC00-1	tw6	psb65	M6	DSMZ17060	DSMZ17101	ATCC19882
Type II secretion system protein E	951											
Type II secretion system protein E nfrB	1698											
Type II secretion system protein GspD	2984											
Type II secretion system protein GspD	2214											
Type II secretion system protein GspE	1737											
Type II secretion system protein GspG	456											
Type II secretion system protein GspG	499											
Type II secretion system protein GspH	476											
Type II secretion system protein GspI	396											
Type II secretion system protein M	654											
Type II secretion system protein N	802											
Type II secretory pathway component PulD-like protein	1701											
Type II/IV secretion system protein	1698											
Type II/IV secretion system protein	1576											
Type III secretion system effector protein	1908											
Type III secretion system effector protein	1386											
Type VI secretion system tip protein VgrG	1615											
Type VI secretion system tip protein VgrG	2393											
Type VI secretion system tip protein VgrG	1321											
Type VI secretion system tip protein VgrG	1844											
Type VI secretion system tip protein VgrG	2071											
Type VI secretion system tip protein VgrG	2368											
Type VI secretion system-associated FHA domain protein TagH	2339											
YscQ/HrcQ family type III secretion apparatus protein	1092											

**Anexo II: Analisis de OTU según sistema de manejo. Rotación vs. No Rotación**

**Clases**

OTU ID	S73	S76	S79	S82	S84	S85
AcidoAcidobacteria_Gp1	394	130	137	145	10	8
AcidoAcidobacteria_Gp10	2	2	9	5	2	1
AcidoAcidobacteria_Gp11	6	4	4	13	2	0
AcidoAcidobacteria_Gp16	236	390	339	379	172	199
AcidoAcidobacteria_Gp17	1	5	4	13	2	0
AcidoAcidobacteria_Gp2	47	10	29	30	1	1
AcidoAcidobacteria_Gp25	7	7	21	33	4	3
AcidoAcidobacteria_Gp3	333	276	200	203	150	123
AcidoAcidobacteria_Gp4	229	299	131	214	401	290
AcidoAcidobacteria_Gp5	38	21	53	96	18	17
AcidoAcidobacteria_Gp6	309	313	266	442	431	261
AcidoAcidobacteria_Gp7	31	34	19	22	9	4
ActinoActinobacteria	2615	2816	3596	2858	4532	4097
ActinoActinobacteria_unclassified	166	158	117	163	200	175
Bacteria_unclassified;Bacteria_unclassified	916	843	771	1205	871	767
Bacteroidetes;Bacteroidetes_unclassified	4	5	8	5	2	2
Bacteroidetes;Cytophagia	14	64	18	36	28	97
Bacteroidetes;Flavobacteriia	20	69	12	8	0	1
Bacteroidetes;Sphingobacteriia	118	189	106	114	92	127
Candidatus_SacchariCandidatus_Saccharibacteria_unclassified	2	3	3	15	0	2
Chloroflexi;Anaerolineae	227	317	247	608	1529	945
Chloroflexi;Caldilineae	5	6	3	7	7	7
Chloroflexi;Chloroflexi_unclassified	15	24	17	49	59	71
Chloroflexi;Chloroflexia	1	3	0	2	3	2
Chloroflexi;Thermomicrobia	3	1	0	6	4	3
Firmicutes;Bacilli	1025	514	1065	695	245	225
Firmicutes;Clostridia	59	72	85	74	60	74
FusoFusobacteriia	1	1	0	2	1	1
Gemmatimonadetes;Gemmatimonadetes	62	70	64	60	7	4
LatesciLatescibacteria_unclassified	9	12	17	62	9	3
Nitrospirae;Nitrospira	37	42	65	95	47	68
Planctomycetes;Planctomycetia	6	10	6	5	1	0
ProteoAlphaproteobacteria	4013	4254	3817	3362	2618	3752
ProteoBetaproteobacteria	195	286	243	291	154	148
ProteoDeltaproteobacteria	88	113	158	210	97	80
ProteoGammaproteobacteria	370	282	221	252	223	469
Verrucomicrobia;Opitutae	5	11	7	7	11	10
Verrucomicrobia;Spartobacteria	530	458	266	310	118	74
Verrucomicrobia;Subdivision3	14	19	26	53	30	28
Verrucomicrobia;Verrucomicrobiae	2	22	5	6	5	16

**Phylum**

OTU	S73	S76	S79	S82	S84	S85
Acidobacteria	1633	1491	1212	1595	1202	907
Actinobacteria	2781	2974	3713	3021	4732	4272
Bacteria_unclassified	916	843	771	1205	871	767
Bacteroidetes	156	327	144	163	122	227
Candidatus_Saccharibacteria	2	3	3	15	0	2
Chloroflexi	251	351	267	672	1602	1028
Firmicutes	1084	586	1150	769	305	299
Fusobacteria	1	1	0	2	1	1
Gemmatimonadetes	62	70	64	60	7	4
Latescibacteria	9	12	17	62	9	3
Nitrospirae	37	42	65	95	47	68
Planctomycetes	6	10	6	5	1	0
Proteobacteria	4666	4935	4439	4115	3092	4449
Verrucomicrobia	551	510	304	376	164	128

## Análisis DESeq

Family	Genus	S73	S76	S79	S82	S84	S85	log2FoldChange	pvalue	padj
Acidimicrobiales_unclassified	Acidimicrobiales_unclassified	5	4	23	18	198	203	-4,239427319	3,84E-09	3,99E-07
Acidimicrobiales_unclassified	Acidimicrobiales_unclassified	5	2	2	14	111	111	-4,509462196	4,91E-09	4,59E-07
Acidimicrobiales_unclassified	Acidimicrobiales_unclassified	1	4	13	19	57	44	-2,790173897	0,000795514	0,006589388
Acidimicrobiales_unclassified	Acidimicrobiales_unclassified	0	1	0	1	10	12	-4,489723209	0,000995153	0,007893756
Acidobacteria_Gp1_unclassified	Acidobacteria_Gp1_unclassified	33	28	25	34	2	5	2,815290319	0,000770981	0,006443195
Acidobacteria_Gp4_unclassified	Acidobacteria_Gp4_unclassified	17	27	6	8	108	84	-2,932898521	6,09E-05	0,00086434
Actinobacteria_unclassified	Actinobacteria_unclassified	15	16	36	40	241	285	-3,561532522	1,56E-09	1,82E-07
Actinobacteria_unclassified	Actinobacteria_unclassified	36	86	9	30	5	0	3,495328169	0,000951192	0,007675132
Actinobacteria_unclassified	Actinobacteria_unclassified	15	26	19	22	91	67	-2,238098148	0,00011867	0,001501017
Actinobacteria_unclassified	Actinobacteria_unclassified	11	29	34	47	2	0	4,308014119	0,000147016	0,001766319
Actinobacteria_unclassified	Actinobacteria_unclassified	22	20	25	29	0	1	4,947596145	0,000270672	0,00294592
Actinobacteria_unclassified	Actinobacteria_unclassified	0	0	0	0	55	77	-9,308573996	6,92E-07	2,82E-05
Actinobacteria_unclassified	Actinobacteria_unclassified	1	0	0	7	19	27	-3,736583476	0,000826163	0,006783232
Actinobacteria_unclassified	Actinobacteria_unclassified	0	0	1	3	21	16	-4,380849552	0,000135142	0,001686566
Actinobacteria_unclassified	Actinobacteria_unclassified	1	0	0	0	26	22	-6,290038227	7,31E-06	0,00016788
Actinobacteria_unclassified	Actinobacteria_unclassified	0	1	0	0	21	16	-5,998380246	3,93E-05	0,000620991
Actinomycetales_unclassified	Actinomycetales_unclassified	0	0	0	0	60	32	-8,869933111	3,49E-06	0,000102145
Rhodobiaceae	Afifella	0	0	0	0	23	52	-8,5485076	9,85E-06	0,00021445
Microbacteriaceae	Agromyces	0	0	2	1	25	49	-5,650645992	2,24E-07	1,11E-05
Alphaproteobacteria_unclassified	Alphaproteobacteria_unclassified	0	0	0	1	16	36	-6,434398887	6,49E-06	0,000159877
Anaerolineaceae	Anaerolineaceae_unclassified	27	89	64	130	848	666	-3,659056528	1,04E-10	2,42E-08
Anaerolineaceae	Anaerolineaceae_unclassified	9	0	10	52	512	256	-4,711853753	1,60E-06	5,53E-05
Anaerolineaceae	Anaerolineaceae_unclassified	0	0	0	0	42	42	-8,742116835	4,96E-06	0,00012905
Iamiaceae	Aquihabitans	0	0	0	2	52	18	-6,1690591	7,35E-07	2,87E-05
Aridibacter_unclassified	Aridibacter_unclassified	0	0	0	1	17	23	-6,095368976	2,58E-05	0,000447879
Aridibacter_unclassified	Aridibacter_unclassified	0	2	0	0	23	36	-5,861543556	1,66E-06	5,54E-05
Micrococcaceae	Arthrobacter	14	13	74	29	3	1	3,57493205	0,000734541	0,006297315
Bacillaceae_1	Bacillaceae_1_unclassified	28	33	57	48	3	0	4,311901075	1,63E-05	0,000310467
Bacillaceae_1	Bacillus	400	189	225	220	52	31	2,440035724	0,000392976	0,004042044
Bacillaceae_1	Bacillus	138	69	90	103	14	4	3,194455124	3,06E-05	0,000520719
Bacillaceae_1	Bacillus	43	30	38	40	4	4	2,954578813	0,000230924	0,002610663
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	49	65	31	35	0	2	5,032286048	7,53E-06	0,00016788
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	19	24	7	76	1	0	5,108056902	0,000295553	0,003179745
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	2	0	0	1	108	86	-7,013672551	2,67E-12	8,34E-10
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	0	3	2	1	34	22	-4,435560388	6,22E-06	0,000157384
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	2	1	0	1	58	53	-5,864961043	1,13E-09	1,58E-07
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	0	0	0	3	33	62	-6,05465652	3,96E-08	2,47E-06
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	0	0	0	0	59	20	-8,668765251	7,46E-06	0,00016788
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	0	0	0	0	35	29	-8,395372787	1,54E-05	0,000303807
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	0	0	0	0	34	28	-8,35423577	1,75E-05	0,000328066
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	0	0	0	0	16	45	-8,264263539	2,47E-05	0,000439299
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	0	2	0	5	22	16	-3,728485826	0,00063557	0,005627761
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	0	0	0	0	1	54	-7,927255521	0,000108441	0,001409732
Bacteria_unclassified	Bacteria_unclassified	1	1	0	1	20	15	-4,620573151	6,71E-05	0,000923757
Betaproteobacteria_unclassified	Betaproteobacteria_unclassified	26	19	11	14	0	1	4,576038017	0,001237431	0,008978568
Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobium	654	955	759	595	128	196	1,939738804	0,000206568	0,002387004
Candidatus_Solibacter_unclassified	Candidatus_Solibacter_unclassified	19	51	22	15	2	0	4,187102779	0,000324327	0,003372998
Chitinophagaceae	Chitinophagaceae_unclassified	41	30	25	30	3	1	3,636056298	0,000150826	0,001787002
Chitinophagaceae	Chitinophagaceae_unclassified	0	0	0	0	11	12	-7,027591271	0,000637332	0,005627761
Chloroflexi_unclassified	Chloroflexi_unclassified	0	0	0	0	38	51	-8,803667457	4,04E-06	0,000110483
Chloroflexi_unclassified	Chloroflexi_unclassified	0	0	0	0	26	25	-8,094698937	3,83E-05	0,000617687
Cytophagales_unclassified	Cytophagales_unclassified	0	1	1	2	30	61	-5,618938556	1,65E-08	1,40E-06
Deltaproteobacteria_unclassified	Deltaproteobacteria_unclassified	17	27	15	33	1	2	3,495017603	0,000608713	0,005531606
Gaiellaceae	Gaiella	86	141	88	136	376	261	-1,806881783	0,000429821	0,004234867
Gaiellaceae	Gaiella	42	51	24	18	2	3	3,449004706	0,000252739	0,002791879
Gaiellaceae	Gaiella	14	18	24	17	1	1	3,730950919	0,001189231	0,008894642
Gaiellaceae	Gaiella	8	2	5	12	102	91	-4,02982348	3,71E-08	2,47E-06
Gaiellaceae	Gaiella	0	1	1	1	137	136	-7,567622508	7,36E-15	6,89E-12
Gaiellaceae	Gaiella	6	9	12	12	51	40	-2,503847601	0,000160733	0,001880574
Gaiellaceae	Gaiella	0	0	0	0	103	54	-9,555218377	3,09E-07	1,44E-05
Gaiellaceae	Gaiella	0	0	0	0	61	38	-8,963964579	2,47E-06	7,67E-05
Gaiellaceae	Gaiella	6	0	0	3	41	32	-3,994091818	0,000143099	0,001762374
Gaiellaceae	Gaiella	0	0	0	0	25	28	-8,139155436	3,35E-05	0,000549884

Geminicoccus	Geminicoccus_unclassified	2	3	6	9	32	59	-3,429117446	7,45E-06	0,00016788
Geminicoccus	Geminicoccus_unclassified	1	1	3	5	45	61	-4,616674484	1,91E-08	1,49E-06
Geminicoccus	Geminicoccus_unclassified	0	0	2	1	14	15	-4,33504261	0,000400267	0,004072283
Geminicoccus	Geminicoccus_unclassified	0	0	0	0	39	25	-8,399973747	1,56E-05	0,000303807
Gemmatimonadaceae	Gemmatimonas	15	15	25	38	3	0	3,454799238	0,001069761	0,008275178
Geodermatophilaceae	Geodermatophilaceae_unclassified	0	2	8	6	42	50	-3,770071084	1,21E-05	0,000249274
Gp1_unclassified	Gp1_unclassified	138	33	38	37	1	1	5,591174981	3,94E-06	0,000110483
Gp1_unclassified	Gp1_unclassified	76	30	29	19	1	0	5,685705173	4,61E-05	0,00069638
Gp1_unclassified	Gp1_unclassified	40	42	23	43	4	0	3,785989803	8,42E-05	0,001126113
Gp1_unclassified	Gp1_unclassified	59	26	8	15	0	0	7,020375083	0,000740605	0,006297315
Gp16_unclassified	Gp16_unclassified	13	59	16	29	2	2	3,37240461	0,000602087	0,005525031
Gp2_unclassified	Gp2_unclassified	37	4	31	30	1	1	4,26233101	0,00062359	0,00561231
Gp3_unclassified	Gp3_unclassified	27	46	13	10	0	1	4,936354187	0,000502066	0,004795247
Gp3_unclassified	Gp3_unclassified	33	18	11	20	1	0	4,766910626	0,000681414	0,005905586
Gp3_unclassified	Gp3_unclassified	6	15	4	14	47	46	-2,564654856	0,000231501	0,002610663
Gp3_unclassified	Gp3_unclassified	1	1	0	2	35	24	-5,022907829	1,22E-06	4,57E-05
Gp3_unclassified	Gp3_unclassified	1	2	0	1	22	8	-4,056663568	0,000517496	0,004843758
Gp3_unclassified	Gp3_unclassified	1	0	0	3	15	13	-3,931796898	0,00108705	0,008339994
Gp4_unclassified	Gp4_unclassified	0	0	0	0	148	82	-10,04308193	4,58E-08	2,68E-06
Gp4_unclassified	Gp4_unclassified	0	0	2	3	84	46	-5,878457753	1,08E-09	1,58E-07
Gp6_unclassified	Gp6_unclassified	35	56	15	23	3	4	2,877764848	0,001203322	0,008894642
Gp6_unclassified	Gp6_unclassified	51	49	16	32	3	0	4,2002158	8,81E-05	0,001160822
Gp6_unclassified	Gp6_unclassified	38	22	17	64	3	3	3,188359014	0,000448914	0,00437691
Gp6_unclassified	Gp6_unclassified	1	1	3	11	48	32	-3,636428154	4,94E-05	0,000733931
Gp6_unclassified	Gp6_unclassified	3	0	0	4	40	15	-4,097692748	0,000147193	0,001766319
Gp6_unclassified	Gp6_unclassified	0	0	2	2	21	12	-4,196883935	0,000309491	0,003291864
Gp6_unclassified	Gp6_unclassified	1	3	2	0	24	9	-3,628477678	0,000967589	0,007740716
Gp6_unclassified	Gp6_unclassified	0	0	0	1	28	17	-6,291970716	1,23E-05	0,000249274
Gp6_unclassified	Gp6_unclassified	0	0	0	0	40	9	-8,04103284	5,46E-05	0,000798666
Acidimicrobiaceae	Ilumatobacter	20	41	62	78	249	272	-2,695870684	2,22E-06	7,17E-05
Acidimicrobiaceae	Ilumatobacter	11	93	6	5	1	0	4,89530402	0,001206858	0,008894642
Intrasporangiaceae	Intrasporangiaceae_unclassified	0	0	0	1	33	67	-7,353586559	5,90E-08	3,25E-06
Jiangellaceae	Jiangella	0	0	0	0	47	66	-9,108767168	1,42E-06	5,10E-05
Xanthobacteraceae	Labrys	14	39	21	22	2	0	4,02657917	0,0004123	0,004118026
Phyllobacteriaceae	Mesorhizobium	105	99	105	69	17	18	2,198383117	0,000559426	0,005184385
Micromonosporaceae	Micromonosporaceae_unclassified	14	33	30	19	60	95	-1,949201395	0,001225011	0,008957895
Micromonosporaceae	Micromonosporaceae_unclassified	3	3	6	3	30	31	-3,218269698	6,06E-05	0,00086434
Micromonosporaceae	Micromonosporaceae_unclassified	0	0	0	0	43	6	-8,024737366	6,27E-05	0,000875517
Mycobacteriaceae	Mycobacterium	1	17	13	9	49	43	-2,537997068	0,001062353	0,008275178
Nocardioideae	Nocardioides	37	66	33	22	0	1	5,618244841	3,23E-05	0,000539266
Nocardioideae	Nocardioides	15	41	16	8	0	1	4,642232583	0,001109239	0,008427541
Nocardioideae	Nocardioides	5	4	11	7	32	35	-2,526682904	0,000746797	0,006297315
Nocardioideae	Nocardioides	2	2	6	2	32	11	-3,051494304	0,001342761	0,009667877
Nocardioideae	Nocardioides	1	0	0	3	20	24	-4,569834709	4,05E-05	0,000620991
Nocardioideae	Nocardioides	2	1	0	0	26	19	-4,891351002	2,03E-05	0,000371906
Chitinophagaceae	Parasegetibacter	0	0	0	0	28	29	-8,237370974	2,49E-05	0,000439299
Sinobacteraceae	Povalibacter	16	27	48	58	120	132	-2,073393746	0,000507579	0,004798928
Rhizobiales_unclassified	Rhizobiales_unclassified	1	12	6	13	197	180	-4,890003594	4,77E-13	2,23E-10
Rhizobiales_unclassified	Rhizobiales_unclassified	99	45	29	3	0	1	5,881636605	7,98E-05	0,001082444
Rhizobiales_unclassified	Rhizobiales_unclassified	10	20	25	23	1	0	4,577705251	0,000846076	0,006886323
Rhizobiales_unclassified	Rhizobiales_unclassified	1	0	3	3	47	49	-4,937791018	3,23E-08	2,33E-06
Rhizobiales_unclassified	Rhizobiales_unclassified	0	0	0	3	23	34	-5,343652867	4,13E-06	0,000110483
Rhizobiales_unclassified	Rhizobiales_unclassified	0	2	0	3	21	31	-4,573442494	1,19E-05	0,000249274
Rhodobiaceae	Rhodobiaceae_unclassified	15	27	27	39	100	78	-2,045797301	0,000324069	0,003372998
Rhodospirillales_unclassified	Rhodospirillales_unclassified	2	2	5	3	22	22	-3,07554059	0,000413562	0,004118026
Rubrobacteraceae	Rubrobacter	4	5	26	18	280	214	-4,472605566	1,18E-09	1,58E-07
Rubrobacteraceae	Rubrobacter	0	4	5	8	58	40	-3,848236108	2,54E-06	7,67E-05
Rhodospirillaceae	Skermanella	17	35	25	25	83	75	-1,92436481	0,00067669	0,005905586
Solirubrobacteriales_unclassified	Solirubrobacteriales_unclassified	23	40	93	111	286	216	-2,254492171	0,000471816	0,004552778
Spartobacteria_unclassified	Spartobacteria_unclassified	153	157	60	82	8	1	4,291595161	6,91E-07	2,82E-05
Spartobacteria_unclassified	Spartobacteria_unclassified	90	139	69	115	10	6	3,335524624	4,39E-07	1,96E-05
Spartobacteria_unclassified	Spartobacteria_unclassified	44	47	25	29	1	0	5,514097562	3,99E-05	0,000620991
Spartobacteria_unclassified	Spartobacteria_unclassified	36	33	10	18	0	0	6,839242223	0,001063042	0,008275178
Spartobacteria_unclassified	Spartobacteria_unclassified	36	35	14	10	0	0	6,821783423	0,001116469	0,008427541
Spartobacteria_unclassified	Spartobacteria_unclassified	0	0	3	1	57	26	-5,486783498	2,24E-07	1,11E-05
Sphingomonadaceae	Sphingomonas	4	3	1	6	2	109	-3,99547842	0,000253536	0,002791879
Sinobacteraceae	Steroidobacter	0	1	0	0	14	17	-5,727547698	0,000116325	0,001491507

Nota: En verde se destacan las muestras del sistema sin rotación con soja